



**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA DA *Legionella*
pneumophila ESTIRPE PARIS APÓS CO-CULTURA EM
*Acanthamoeba castellanii***

CATARINA ISABEL GAIO DA SILVA CUNHA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

AGOSTO 2013



ESTUDO DA EXPRESSÃO GÉNICA DA *Legionella pneumophila* ESTIRPE PARIS APÓS CO-CULTURA EM *Acanthamoeba castellanii*

CATARINA ISABEL GAIO DA SILVA CUNHA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA TERESA MARQUES

CO-ORIENTADOR: MESTRE MARIA DE JESUS CHASQUEIRA

**DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGIA-PARASITOLOGIA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

AGOSTO 2013

Esta dissertação foi escrita de acordo com as regras anteriores ao novo acordo ortográfico.

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO

Study of genetic expression of *Legionella pneumophila* after co-culture in *Acanthamoeba castellanii*. Catarina Cunha, Lúcia Rodrigues, Maria-Jesus Chasqueira, Teresa Marques. Faculdade de Ciências Médicas, Microbiology Department, CEDOC, Lisbon – Portugal.

Poster apresentado no ***Portuguese RNA 2012 Meeting*** e publicado no livro de resumos 26-27 Janeiro de 2012. Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Genetic expression of *L. pneumophila* Paris after *Acanthamoeba castellanii* infection Maria-Jesus Chasqueira, Lúcia Rodrigues, Catarina Cunha, Teresa Marques. Faculdade de Ciências Médicas, Microbiology Department, CEDOC, Lisboa – Portugal.

Poster apresentado no ***1ST Meeting of the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)*** e publicado no livro de resumos 5-7 Setembro de 2012. Dresden – Alemanha

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma directa e indirecta de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Professora Doutora Teresa Marques, pela oportunidade, orientação, rigor e confiança;

À Mestre Maria de Jesus Chasqueira, pela co-orientação, exigência de método e rigor. Pelos esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela revisão crítica do texto e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta tese;

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, pelo apoio e disponibilidade com um agradecimento especial à Lúcia Rodrigues;

Ao Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular, Hospital Egas Moniz – CHLO pela disponibilidade do equipamento de PCR em tempo real;

À família, amigos e colegas de mestrado pela motivação, compreensão e força, com que sempre me acompanharam;

Ao Jorge, pela paciência apoio, companheiro dos bons e menos bons momentos, pela tolerância e carinho... por tudo!

À Beatriz... por existir!

Dedico esta dissertação ao meu Pai... até sempre.

A *Legionella* é um bacilo Gram-negativo que replica dentro de protozoários como *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) e no interior de macrófagos alveolares humanos, podendo resultar numa pneumonia grave.

A *Legionella* em meio líquido tem um ciclo de vida bifásico, apresentando traços replicativos na fase exponencial e expressando factores transmissíveis na fase estacionária.

Estudos recentes demonstraram que a *Legionella* precisa de assegurar um tempo preciso no seu ciclo de vida para efectuar com êxito a infecção das células hospedeiras. Muitos modelos de estudo foram desenvolvidos a fim de aumentar o conhecimento sobre o ciclo de vida intracelular e identificar os genes necessários para a modulação da célula hospedeira. Embora o conhecimento sobre a interacção bactéria-hospedeiro ainda seja limitado, parece que esta interacção gera um conjunto de características de virulência permitindo que a bactéria infecte células fagocíticas humanas e cause doença.

O objectivo do presente projecto de investigação foi investigar e seleccionar genes críticos para a infecciosidade da *Legionella pneumophila* estirpe Paris (*Lp* Paris), desenhar e otimizar uma técnica de PCR em tempo real para o estudo da expressão génica e comparar o perfil de expressão da *Lp* Paris antes e depois da co-cultura em *A. castellanii*.

Os resultados mostraram que oito dos 12 genes em estudo alteraram a sua expressão relativa após co-cultura em *A. castellanii* quando os ensaios foram realizados com culturas de *Lp* Paris na fase estacionária precoce (cinco foram induzidos e três reprimidos) Quando os ensaios foram realizados com culturas de *Lp* Paris na fase estacionária tardia 11 genes apresentaram repressão na sua expressão relativa.

Analizando os resultados, concluímos que o perfil de expressão de *Lp* Paris foi modificado pela interacção com *A. castellanii*, no entanto essa mudança foi dependente da fase do seu ciclo de vida.

Legionella is a pathogenic Gram-negative bacterium that replicates not only within aquatic protozoa like *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*), but also within human alveolar macrophages, which can result in a severe pneumonia.

Legionella has a biphasic life cycle in broth, where exponential phase cultures display replicative traits and stationary bacteria express transmissive factors.

Recent studies demonstrated that for successful infection of host cells, *Legionella* needs to ensure a precise timing of its life cycle. Many models of study were developed in order to learn about the intracellular life cycle and to identify the genes necessary for the host cell modulation. Although knowledge about the bacteria-host interaction is still limited, it appears that this interaction generate a pool of virulence traits, allowing the bacterium to infect human phagocytic cells and cause disease.

The purpose of the present study was to investigate and select de critical genes for the infectivity of *Legionella pneumophila* strain Paris (*Lp* Paris), design and optimize a real time PCR technique for gene expression study and compare the expression profile of *Lp* Paris before and after co- culture of *A. castellanii*.

The results show that eight of 12 genes in study changed its relative expression after co-culture in *A. castellanii* when we performed the intracellular assays with early stationary phase *Lp* Paris cultures (five were induced and tree were repressed). When we performed the intracellular assays with late stationary phase *Lp* Paris cultures 11 genes showed a repressed relative expression.

Analysing the results, we conclude that the expression profile of *Lp* Paris was modified by interaction with *A. castellanii* but this change was dependent of the timing of its life cycle.

	PÁGINA
Elementos bibliográficos resultantes da dissertação.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
<i>Abstract</i>	v
Índice da dissertação.....	vi
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
1 – Introdução.....	1
1.1 - Características gerais das bactérias do género <i>Legionella</i>	2
1.1.1 – Genoma.....	3
1.2 – Patogénese.....	3
1.2.1 - Ciclo de Vida da legionela e factores de virulência.....	4
1.3 – Epidemiologia.....	7
1.4 – Clínica.....	9
1.5 - Diagnóstico Laboratorial.....	9
1.5.1 - Isolamento em cultura.....	10
1.5.2 - Detecção directa de antigénios.....	11
1.5.3 - Detecção de antigénios na urina.....	11
1.5.4 - Diagnóstico serológico.....	12
1.5.5 - Amplificação de ácidos nucleicos.....	12
1.6 – Terapêutica.....	13
1.7 - Controlo e Prevenção.....	13
1.8 - Expressão génica.....	15
1.9 - PCR em tempo real.....	16
1.9.1.- Detecção de produtos de PCR em tempo real.....	18
1.9.1.1.- <i>SYBR green</i>	18
1.9.2 – Quantificação.....	19
1.9.3 - Gene de referência.....	20
1.9.4 - Eficiência da reacção de PCR em tempo real.....	21

1.10 – Objectivo.....	22
2 - Material e Métodos.....	24
2.1 – Culturas.....	25
2.1.1 - Cultura líquida de <i>Lp</i> Paris.....	25
2.1.2 - Cultura de <i>A. castellanii</i>	25
2.1.3 - Ciclo de infecção em <i>A. castellanii</i>	26
2.1.3.1 - Procedimento de infecção.....	26
2.2 - Extracção de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	27
2.2.1 - Extracção de RNA.....	27
2.2.2 - Tratamento com DNase.....	28
2.2.3 - Síntese de cDNA.....	28
2.2.4 - Avaliação da eficácia relativamente aos pontos 2.2.2 e 2.2.3.....	28
2.3 - Estudo da expressão génica.....	29
2.3.1 - Selecção dos genes alvo.....	29
2.3.2 - Desenho dos <i>primers</i>	30
2.3.3 - PCR em tempo real.....	32
2.3.4 - Optimização da concentração de <i>primers</i>	34
2.3.5 - Avaliação da especificidade dos <i>primers</i>	34
2.3.6 - Avaliação da sensibilidade dos <i>primers</i>	34
2.3.7 - Optimização do volume de amostra.....	34
2.3.8 - Avaliação da reprodutibilidade intra e inter-ensaio.....	34
2.3.9 – Estudo da linearidade.....	35
2.3.10 – Estudo da eficiência da técnica de PCR em tempo real.....	35
2.3.11 – Cálculo da expressão génica e análise de resultados.....	35
3 - Resultados e Discussão.....	37
3.1 - Culturas da <i>Lp</i> Paris e ciclos de infecção em <i>A. castellanii</i>	37
3.2 - Extracção de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	39
3.3 - Estudo da expressão génica.....	41
3.3.1 - Selecção dos genes alvo.....	41
3.3.2 – Desenho, selecção e estudo da especificidade teórica dos <i>primers</i>	41
3.3.3 - PCR em tempo real.....	51
3.3.3.1 - Optimização da concentração de <i>primers</i>	51

3.3.3.2 - Avaliação da especificidade analítica dos <i>primers</i>	53
3.3.3.3 - Avaliação da sensibilidade dos <i>primers</i>	60
3.3.3.4 - Optimização do volume de amostra.....	61
3.3.3.5 - Avaliação da reprodutibilidade intra e inter-ensaio.....	62
3.3.3.6 - Estudo da linearidade e eficiência.....	65
3.3.3.7 - Cálculo da expressão génica e análise de resultados.....	69
4 – Conclusões.....	76
4.1 – Perspectivas futuras.....	78
5 – Referencias Bibliográficas.....	80
Anexo 1.....	I
Anexo 2.....	II
Anexo 3.....	III
Anexo 4.....	V
Anexo 5.....	VII
Anexo 6.....	X
Anexo 7.....	XI
Anexo 8.....	XII
Anexo 9.....	XIII
Anexo 10.....	XVII
Anexo 11.....	XIX

FIGURA		PÁGINA
Figura 1	Genoma circular da <i>Lp</i> Paris	3
Figura 2	Ciclo de Vida da <i>Legionella</i>	4
Figura 3	Genoma circular da <i>A. castellanii</i>	5
Figura 4	Cultura de <i>L. pneumophila</i> em meio BCYE α com cinco dias de incubação	10
Figura 5	Cultura de <i>L. pneumophila</i> em meio BCYE α com 72 horas de incubação	11
Figura 6	Curva de amplificação padrão	17
Figura 7	<i>SYBR green</i>	18
Figura 8	Curvas de dissociação	19
Figura 9	Base do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$	20
Figura 10	Curva padrão da reacção de PCR em tempo real	21
Figura 11	Parâmetros definidos no <i>Primer Express</i> 3.0	30
Figura 12	Página <i>blastn</i>	31
Figura 13	Página principal do programa <i>Gene Runner</i> para análise de oligonucleotidos	32
Figura 14	Programa de PCR tempo real	33
Figura 15	Exemplo de gráfico de uma cultura líquida de <i>Lp</i> Paris	37
Figura 16	Morfologia de <i>A. castellanii</i> em meio MI observada em microscópio invertido (40x).	39
Figura 17	Exemplo de dois extractos de RNA total	40
Figura 18	Electroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos obtidos após PCR para o gene <i>mip</i>	40
Figura 19	<i>Gene Runner</i> para o primer F da <i>gyrA</i>	50
– A		
Figura 19	<i>Gene Runner</i> para o primer R da <i>gyrA</i>	50
B, C e D		
Figura 19	<i>Gene Runner</i> para os primers F \leftrightarrow R da <i>gyrA</i>	50
– E		
Figura 20	Curva de dissociação e <i>Tm</i> para o par de primers <i>gyrA</i>	53
Figura 21	Curvas de dissociação e <i>Tm</i> para o par de primers <i>lpp0972</i> e <i>lpp1316</i>	53
Figura 22	Curvas de dissociação e <i>Tm</i> para o par de primers <i>lpp1612b</i> e <i>lpp2694</i>	54
Figura 23	Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por PCR tempo real dos primers: <i>lpp1330</i> , <i>lpp0094</i> , <i>lpp1315</i> , <i>lpp1177</i> e <i>lpp1170</i> .	55
Figura 24	Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por PCR tempo real dos primers: <i>lpp2607</i> , <i>lpp1612a</i> , <i>lpp0845</i> , <i>lpp1900</i> e <i>lpp1340</i> .	55
Figura 25	Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por	55

	PCR tempo real dos <i>primers</i> : gyrA, lpp1316, lpp1612b, lpp0972 e lpp2694	
Figura 26	Curva de amplificação e dissociação referente ao par de <i>primers</i> lpp1177 com a amostra de DNA de <i>A. castellanii</i> [5ng/μl].	58
Figura 27	Curva de amplificação e dissociação referente ao par de <i>primers</i> lpp1612a com a amostra de DNA de <i>A. castellanii</i> [5ng/μl].	58
Figura 28	Curva de amplificação e dissociação referente ao par de <i>primers</i> lpp2607 com a amostra de DNA de <i>A. castellanii</i> [5ng/μl].	58
Figura 29	Curva de amplificação e dissociação referente ao par de <i>primers</i> lpp2694 com a amostra de DNA de <i>A. castellanii</i> [5ng/μl].	59
Figura 30	Curva de dissociação referente ao par <i>primers</i> lpp2694 e as amostras de DNA <i>Lp</i> Paris [5ng/μl] e DNA de <i>A. castellanii</i> [5ng/μl].	59
Figura 31	Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação para os pares de <i>primers</i> lpp2607 e lpp1612a com o DNA de <i>A. castellanii</i> .	60
Figura 32	Gráfico do estudo da linearidade	66
Figura 33	Gráfico de dispersão simultâneo para os <i>primers</i> gyrA, lpp0972, lpp1330, lpp1612b, lpp1900	67
Figura 34	Gráfico de validação experimental (ΔC_t vs Log DNA) para os <i>primers</i> gyrA e lpp1900	68
Figura 35	Expressão relativa de mRNA de <i>Lp</i> Paris após co-cultura em <i>A. Castellanii</i> (Precoce)	71
Figura 36	Expressão relativa de mRNA de <i>Lp</i> Paris após co-cultura em <i>A. Castellanii</i> (Tardia)	73
Figura 37	Gráfico representativo da expressão relativa de mRNA de <i>Lp</i> Paris na fase exponencial da cultura líquida	75
Figura 38	Marcador de peso molecular (100pb)	X

TABELA		PÁGINA
Tabela 1	Espécies/subespécies do género <i>Legionella</i> .	1
Tabela 2	Factores de virulência mais importantes em <i>Legionella</i> .	7
Tabela 3	Genes seleccionados (induzidos e reprimidos) e respectiva função.	29
Tabela 4	Exemplo de monitorização de uma cultura líquida de <i>Lp</i> Paris à DO _{550nm}	37
Tabela 5	Lista dos genes seleccionados	47
Tabela 6	Gene <i>gyrA</i> , posição do gene alvo no genoma da <i>Lp</i> Paris, nome do <i>primer</i> , respectiva sequência, zona de 100% de homologia e tamanho do fragmento formado.	49
Tabela 7	Resultados para optimização da concentração de <i>primers</i> .	52
Tabela 8	<i>Tm</i> para cada par de <i>primers</i> determinada por PCR em tempo real	54
Tabela 9	Resultados da especificidade analítica dos pares de <i>primers</i> desenhados neste estudo	57
Tabela 10	Resultados do segundo ensaio referente ao estudo da especificidade do par de <i>primers</i> lpp2694 com o DNA de <i>A. castellanii</i> 5 ng/μl	60
Tabela 11	Resultados do estudo da sensibilidade dos <i>primers</i> .	61
Tabela 12	Resultados do estudo da optimização do volume de amostra	62
Tabela 13	Resultados do estudo da reprodutibilidade intra-ensaio	63
Tabela 14	Resultados do estudo da reprodutibilidade inter-ensaio	64
Tabela 15	Resultados do coeficiente de variação (em percentagem) referentes ao estudo da reprodutibilidade inter-ensaio.	65
Tabela 16	Valores obtidos no ensaio para o cálculo da linearidade.	65
Tabela 17	Valores obtidos no ensaio para o cálculo da eficiência	67
Tabela 18	Valores da expressão génica relativa da <i>Lp</i> Paris após co-cultura em <i>A. castellanii</i> utilizando como inoculo a fase estacionária precoce	70
Tabela 19	Valores da expressão génica relativa da <i>Lp</i> Paris após co-cultura em <i>A. castellanii</i> utilizando como inoculo a fase estacionária (tardia)	72
Tabela 20	Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ resultantes do cálculo da expressão génica relativa para a fase estacionária da cultura líquida	74

1 - INTRODUÇÃO

Em Julho de 1976, um surto de pneumonia causada por uma bactéria até então desconhecida, afectou os participantes na 58ª convenção da Legião Americana, realizada no hotel Bellevue Stratford, em Filadélfia. Dos cerca de 4400 participantes, 221 adoeceram, 147 foram hospitalizados, tendo-se registado 34 óbitos. Apesar da intensa investigação laboratorial, a causa do surto não foi detectada durante meses [31].

Cerca de seis meses mais tarde, Joseph McDade e Charles Shepard, investigadores do Centro para Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), anunciaram a descoberta do agente etiológico, um bacilo de Gram negativo [52; 53].

Devido à associação histórica com a convenção da Legião Americana, a doença foi chamada Doença dos Legionários (DL) e o seu agente etiológico *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) pertencente à família *Legionellaceae* [8, 59].

Hoje, a família *Legionellaceae* inclui um único género, *Legionella*. O número de espécies e serogrupos tem vindo a aumentar sendo actualmente conhecidas 62 espécies/subespécies e cerca de 70 serogrupos (Tabela 1) [2, 16, 28, 33, 36].

Tabela 1 - Espécies/subespécies do género *Legionella* [33] Adaptado

de: http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Legionella (Fev 2013)

Género	<i>Legionella</i>			
Espécies:	Total: 62 (inclui subespécies)			
	adelaidensis anisa beliardensis birminghamensis bozemaniae bozemanii brunensis busanensis cardiaca cherrii cincinnatiensis drancourtii dresdenensis drozanskii dumoffii erythra fairfieldensis	fallonii feeleei geestiana gormanii gratiana gresilensis hackeliae impletisoli israelensis jamestowniensis jordanis lansingensis londiniensis longbeachae lytica maceachernii massiliensis	mcdadei moravica nagasakiensis nautarum oakridgensis parisiensis pittsburghensis pneumophila pneumophila subsp. fraseri pneumophila subsp. pascullei pneumophila subsp. pneumophila quateirensis quinlivanii rowbothamii rubrilucens sainthelensi	santicrucis shakespearei spiritensis steelei steigerwaltii taurinensis tucsonensis tunisiensis wadsworthii waltersii worsleiensis yabuuchiae

Após a identificação do agente responsável pela DL, foi possível concluir, através de estudos retrospectivos, que alguns surtos de doenças respiratórias de etiologia desconhecida, anteriores a 1976, tinham sido provocados pela *L. pneumophila* [49].

O caso mais interessante verificou-se no Departamento de Saúde de Pontiac, Michigan, em Julho de 1968, onde 95 dos 100 funcionários, que trabalhavam num dos edifícios do referido departamento, contraíram uma estranha doença caracterizada por febre, dor de cabeça, dores musculares e, nalguns casos, diarreia, vômitos e dores no tórax. Os sintomas desta doença, que ficou conhecida desde então por Febre de Pontiac, duraram três ou quatro dias e todos os pacientes recuperaram sem medicação. Nessa altura não tinha sido possível isolar nenhum organismo patogénico. Em 1977, nove anos depois, amostras de soro dos doentes de Pontiac foram testadas procurando anticorpos contra a nova bactéria responsável pela DL. Na maioria dos soros foi possível provar a seroconversão durante a doença, indicando que a Febre de Pontiac fora causada pelo mesmo agente [34, 44].

1.1 - Características gerais das bactérias do género *Legionella*

Legionella é um bacilo de Gram negativo, pleomórfico variando entre 0,3 e 0,9 µm de largura e 2 a 20 µm de comprimento. São microrganismos geralmente móveis devido à existência de um ou mais flagelos polares ou subpolares, aeróbios obrigatórios, crescem a temperaturas que variam entre os 20°C e os 42°C [16, 28, 49].

Têm fraca actividade metabólica e não crescem em meios de cultura correntes (exemplo: gelose de sangue), necessitando de sais de ferro e L-cisteína para o seu metabolismo, pelo que o meio de cultura mais utilizado é o *Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE- α). Trata-se de um meio tamponado constituído por extracto de levedura, ferro, L-cisteína, α -cetoglutarato e carvão, podendo ser ou não suplementado com antibióticos [16, 28, 49].

1.1.1 - Genoma

Segundo dados do *National Center for Biotechnology Information* [60] existem cinco genomas de *Legionella* completamente sequenciados: *Legionella longbeachae* com um tamanho de 4,077,332 nucleótidos (nt); *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* estirpe Philadelphia com 3,397,754 nt, *Legionella pneumophila* estirpe Corby com 3,576,470 nt, *Legionella pneumophila* estirpe Lens com 3,345,687 nt e por fim a *Legionella pneumophila* estirpe Paris (*Lp* Paris) com 3,503,610 nt, estirpe que será utilizada neste trabalho [13, 36, 60].

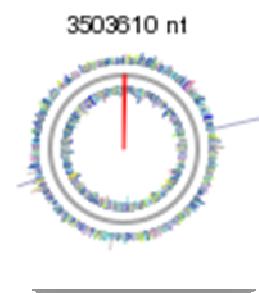


Figura 1 - Genoma circular da *Lp* Paris 3,503,610 pb [13, 60]

O primeiro relato de DL atribuída à estirpe *Lp* Paris ocorreu no verão de 1980, três casos esporádicos, nos subúrbios a nordeste de Paris [77]. A presença de um clone endêmico de *L. pneumophila* serogrupo 1 (sg1) levantou suspeita quando Lawrence e colaboradores em 1997 relataram que 33% dos casos de DL identificados na região de Paris entre 1988 e 1997 tinham sido causados por uma única estirpe *L. pneumophila* sg1. Os casos não tinham aparente ligação epidemiológica, uns eram infecções nosocomiais e outros, infecções da comunidade. A mesma estirpe tem sido desde então repetidamente recuperada de toda a rede de distribuição de água de Paris sugerindo que essa estirpe está bem adaptada à sobrevivência no meio ambiente [7, 22, 46].

1.2 – Patogénese

A legionela é um parasita intracelular de protozoários de vida livre. Esta bactéria já foi encontrada a multiplicar-se em 14 espécies de amibas e 2 espécies de protozoários ciliados. Os protozoários são os seus hospedeiros naturais. A infecção de células humanas fagocíticas como os macrófagos alveolares é uma infecção oportunista. Muito do nosso conhecimento da patogénese da legionela vem da análise do processo de infecção em protozoários [1, 14, 16, 28, 32, 72].

Como reservatórios naturais, protozoários como a *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*), *Hartmanella spp* ou *Naeglaria spp* têm exercido pressão selectiva para a evolução das características de virulência da *L. pneumophila* permitindo assim a infecção de células humanas. Por exemplo, quando ingeridas por amibas a *L. pneumophila* inibe a via de degradação fago-lisossomal, uma característica de virulência igualmente observada aquando da ingestão por macrófagos humanos. Isto sugere que a interacção com amibas é a força motriz na evolução da patogenicidade da *L. pneumophila* [9, 10, 14, 72].

A compreensão da patogénese da *Legionella spp* tem aumentado nos últimos anos. As duas maiores áreas de sucesso são a caracterização do ciclo de vida da legionela e a identificação dos factores de virulência por técnicas de biologia molecular [28, 36].

1.2.1 - Ciclo de vida da legionela e factores de virulência

Uma série de experiências realizadas nos anos 80 por Horwitz e colaboradores levaram à descrição do modo de infecção desta bactéria nos humanos. Estes estudos demonstraram que as bactérias do género *Legionella* entram no fagócito por um processo denominado fagocitose. Após este processo, as bactérias alojam-se num

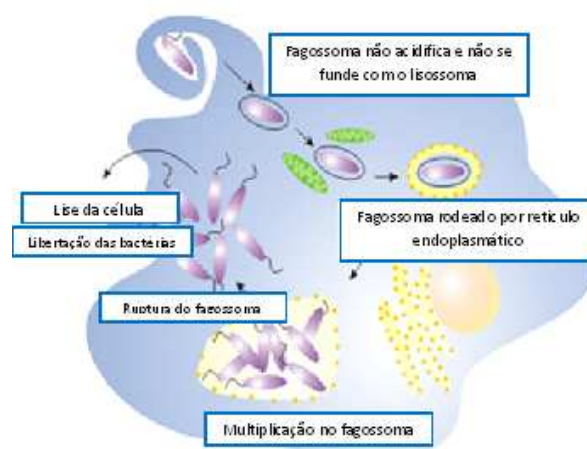


Figura 2 – Ciclo de vida da *Legionella*. Adaptado de Swanson, M. [73]

único fagossoma. O processo de fusão com os lisossomas é inibido bem como a sua acidificação. No interior da célula as bactérias iniciam a sua multiplicação.

Uma diferença fenotípica entre estirpes de legionela virulentas e não virulentas corresponde à presença de flagelos. Foram descritas duas fases de crescimento para a bactéria. Uma fase replicativa seguida por uma fase infecciosa ou transmissível. A fase replicativa apresenta bactérias sem motilidade com uma toxicidade baixa ou inexistente e resistentes ao sódio. A fase infecciosa ocorre após uma transformação que a leva a

uma forma bacilar menor, mais grossa. Esta nova forma é móvel devido à presença de flagelos, é sensível ao sódio e é muito mais tóxica para o seu hospedeiro. A mudança da fase replicativa para a fase infecciosa ocorre quando a bactéria esgota as fontes de nutrientes do hospedeiro [12, 28, 37, 42, 74].

Como a *L. pneumophila* pode infectar uma grande diversidade de espécies de protozoários, pensa-se que esta tenha compilado um largo número de factores de virulência para lidar com as diferentes condições intracelulares de cada espécie. A sequenciação dos genomas de três isolados de *L. pneumophila* estirpes Filadélfia, Paris e Lens, revelou que o genoma da *L. pneumophila* é muito plástico e codifica uma multiplicidade de proteínas que contêm motivos de proteínas eucarióticas. Tais genes poderão ter sido adquiridos através de transferência horizontal, a partir de uma célula hospedeira ou outras bactérias que co-habitem no mesmo biofilme, ou como resultado da coevolução de *L. pneumophila* com os seus hospedeiros protozoários [10, 13, 38, 55, 70, 71, 75].

A *A. castellanii*, hospedeiro natural da legionela, tem sido amplamente utilizada para estudar o ciclo de vida da legionela bem como os seus factores de virulência. O seu genoma está completamente sequenciado apresentando um tamanho de 41591 nt [60].

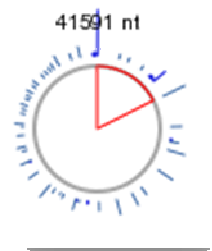


Figura 3 - Genoma circular da *A. castellanii* [60]

Tal como outras bactérias de Gram negativo a legionela é capaz de entrar num estado viável mas não cultivável. Em laboratório, poderá demonstrar-se que a reentrada para o estado cultivável pode ocorrer após a sua absorção pelos protozoários [49, 72].

O gene *mip* (*Macrophage Infectivity Potentiator*), descrito em 1989, foi o primeiro gene associado à virulência da legionela. A proteína Mip é necessária para uma infecção eficiente tanto de células fagocíticas de mamíferos como de protozoários mas o seu mecanismo de acção ainda não é totalmente conhecido [28, 73, 79].

Para além deste, diversos genes foram relacionados com a virulência destas bactérias tais como os genes necessários ao processo de infecção, ligação da célula bacteriana às células hospedeiras, sobrevivência e replicação intracelular, e os genes necessários à transmissão entre células hospedeiras. O produto dos genes envolvidos na ligação inicial às células hospedeiras e as fases iniciais da infecção intracelular incluem, entre outros, os pili de tipo IV, a proteína de choque térmico Hsp60, a proteína formadora de poros RtxA e a proteína de infecciosidade para macrófagos MilA [38].

Os genes relacionados com o sistema Dot/icm (*defective for organelle trafficking/intracellular multiplication*) apresentam um papel fundamental no processo de infecção das células hospedeiras. Este sistema codifica para o sistema de secreção tipo IV (T4SS), importante para a entrada na célula hospedeira e como mediador da transferência de macromoléculas entre as células. Os T4SSs são frequentemente encontrados em bactérias que interagem com hospedeiros eucariotas. Muitos destes sistemas são agora reconhecidos como máquinas de transporte que têm um papel específico no transporte de proteínas de virulência, conhecidas como efectores, através da membrana externa da célula bacteriana directamente para células hospedeiras eucariotas [10, 39, 71, 75, 80].

O sistema de secreção tipo II (Lsp) é crítico para a replicação intracelular. Este sistema envolve dois processos, uma translocação da proteína através da membrana bacteriana interna, pela via Sec ou Tat, seguido pelo transporte da proteína a partir do periplasma para o exterior por uma membrana exterior [71].

Potenciais factores de virulência incluem ainda, entre outros, os flagelos, diversas citotoxinas, fosfolipases, lipopolissacáridos e compostos relacionados com a aquisição de ferro [71, 72, 73].

Na tabela 2 são referenciados alguns dos factores de virulência considerados mais importantes.

Tabela 2- Factores de virulência mais importantes em *Legionella* [40]

▶ Aderência	▶ Motilidade	▶ Proteínas de stress
Hsp60	Flagelo	GspA
MOMP	▶ Aquisição de nutrientes	KatAB
pili Tipo IV	Pht	SodB
▶ Endotoxinas	▶ Regulação	SodC
LSP	CsrA	▶ Toxinas
▶ Enzimas	LetA/S	RtxA
Mip	RelA	▶ Sem classificação
▶ Absorção de ferro	RpoS	LigA
CcmC	▶ Sistemas de secreção	MilA
FeoAB	<i>lsp</i> (T2SS)	<i>loci eml</i>
FrgA	Dot/Icm (T4SS)	<i>loci enh</i>
IraAB		<i>loci pmi</i>
Legiobactin		

1.3 - Epidemiologia

A legionela é uma bactéria ubíqua, largamente disseminada em água doce (rios, lagos, fontes, nascentes, cursos de água) e ambientes húmidos, como a terra para jardinagem. Nestes ambientes naturais, esta bactéria encontra-se geralmente em baixas concentrações representando menos de 1% da população bacteriana total. É também encontrada em instalações hidrotermais, frequentemente associadas a estâncias de hidroterapia. Nestes casos as concentrações detectadas podem atingir valores mais elevados [1, 28, 30, 61, 67, 72].

Estas bactérias podem ainda ser isoladas de ambientes aquáticos artificiais, como sistemas de distribuição de água potável, sistemas que envolvem o aquecimento central de água em grandes edifícios, sistemas de circulação e distribuição de água quente como cilindros e caldeiras de aquecimento e principalmente, em sistemas de humificação de sistemas de ventilação e ar condicionado nomeadamente torres de arrefecimento, dispositivos de evaporação ou humidificadores. Estes ambientes funcionam como amplificadores, uma vez que favorecem o crescimento deste

microrganismo, originando concentrações muito mais elevadas do que as que se verificam no seu ambiente natural [15, 49].

Em sistemas aquáticos artificiais, as legionelas conseguem sobreviver associando-se a biofilmes. A matriz que compõe um biofilme é capaz de fornecer protecção e um gradiente específico de determinados nutrientes. A disponibilidade destes nutrientes levou alguns investigadores a proporem que os biofilmes suportam a sobrevivência e a multiplicação da *Legionella* fora da célula hospedeira. Este conceito é plausível uma vez que a maioria das bactérias intracelulares facultativas é capaz de se multiplicar extracelularmente em determinados ambientes específicos [15, 28, 32, 49].

A infecção por bactérias do género *Legionella* ocorre através da inalação de aerossóis com um tamanho compreendido entre 1µm e 10µm. Para ocorrer a infecção, a bactéria deve dispersar-se no ar a partir do sistema de água contaminada. A permanência do aerossol no ar depende de inúmeros factores tais como, temperatura, humidade relativa (o seu aumento favorece a permanência), velocidade de circulação do ar (quanto menor maior o tempo de permanência), e do tamanho das gotas (menor volume aumenta o poder de dispersão) [28, 61, 72].

As infecções por *Legionella* afectam preferencialmente adultos com mais de 50 anos de idade (duas a três vezes mais homens do que mulheres), sendo rara em indivíduos abaixo dos vinte anos. São considerados factores de risco o tabagismo, doenças crónicas debilitantes (alcoolismo, diabetes, insuficiência renal), neoplasias do foro hematológico, doentes submetidos a transplantação de órgãos ou ainda outras doenças com compromisso da imunidade ou que imponham medicação com corticoides ou quimioterapia [17, 79, 61].

Não existe referência de transmissão da doença de indivíduo para indivíduo [57, 71, 73].

1.4 - Clínica

Segundo estudos Europeus e Norte Americanos as infecções por *Legionella* constituem 2% a 15% de todos os casos de pneumonias adquiridos na comunidade que requerem hospitalização, figurando entre as quatro primeiras causas quando se utilizam métodos de cultura, sendo a segunda causa das que exigem tratamento em unidades de cuidados intensivos [50, 73].

A apresentação clínica das infecções por estas bactérias inclui essencialmente duas formas de doença, a Febre de Pontiac e a Doença dos Legionários.

A Febre de Pontiac corresponde a uma doença aguda, auto-limitada, não fatal, com um período de incubação curto (24 a 48 horas). Os sintomas mais frequentes correspondem a mal-estar, mialgias, cefaleias, febre, calafrios e tosse. Indivíduos que adquiram esta doença recuperam totalmente em poucos dias, sem necessitarem de qualquer antibiótico [2, 49, 59, 76, 79].

A DL é uma pneumonia cujo período de incubação varia de 2 a 10 dias. As manifestações clínicas são normalmente mais severas do que as associadas a “pneumonias atípicas”. Inicialmente com sintomas gerais (mal-estar, cefaleias, mialgias, febre e calafrios intermitentes), a que se seguem sintomas mais específicos, como tosse (na maioria dos casos sem expectoração), dor torácica pleurítica, dispneia, diarreia, alterações do estado mental (confusão mental, desorientação, alucinações, depressão, coma) e, raramente, convulsões [49, 59, 72, 79].

As razões por que determinados indivíduos desenvolvem uma ou outra forma da doença ainda não são totalmente conhecidas [79].

1.5 - Diagnóstico Laboratorial

Como já foi referido, as infecções por bactérias do género *Legionella* não apresentam sinais ou sintomas clínicos patognomónicos da doença. Apenas os exames

microbiológicos permitem estabelecer a etiologia da infecção pelo que estes devem ser especificamente requisitados sempre que a clínica e a história epidemiológica o justifiquem [56].

1.5.1 - Isolamento em cultura

A cultura corresponde ao método de excelência (*gold-standard*) para o diagnóstico da DL sendo ainda o que apresenta maior especificidade (>99%). Trata-se de um diagnóstico confirmado (de acordo com as orientações do *European Center for Disease Prevention and Control* - ECDC) [24]. Os produtos biológicos como expectorações, secreções brônquicas, lavado bronco-alveolar, líquido pleural deverão ser colhidos antes de iniciada a terapêutica antibiótica. O método de cultura requer um meio especial de processamento (BCYE- α é o mais comumente utilizado) e conhecimentos técnicos para identificação das colónias. As placas de cultura são incubadas a 36°C (+/-1) até 10 dias, sendo examinadas a cada dois ou três dias. A detecção de uma colónia típica de *Legionella* deve ser confirmada com a observação à lupa, aglutinação com latex e repicagem para uma placa de gelose de sangue (não deve apresentar crescimento). O facto de a bactéria apresentar um crescimento muito lento, é uma importante desvantagem desta metodologia [16, 28, 58, 79].

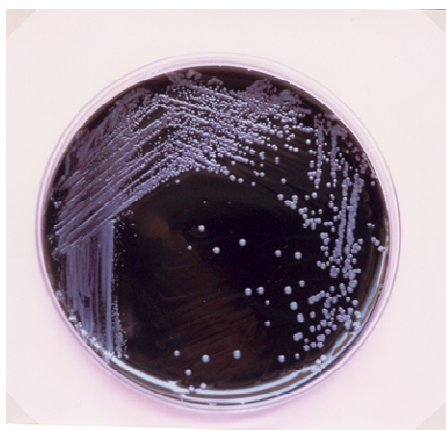


Figura 4 - Cultura de *L. pneumophila* em meio BCYE α com cinco dias de incubação. Observam-se colónias redondas de dimensões variáveis e tom azul anilado [51].

As colónias apresentam formas redondas, convexas, de bordos ligeiramente irregulares, translúcidas, de superfície lisa e brilhante, tornando-se gradualmente viscosas à medida que a cultura envelhece. Observadas à lupa (40x) sob luz incidente, têm um aspecto característico semelhante a “vidro moído”, por vezes com tom anilado [49, 51].

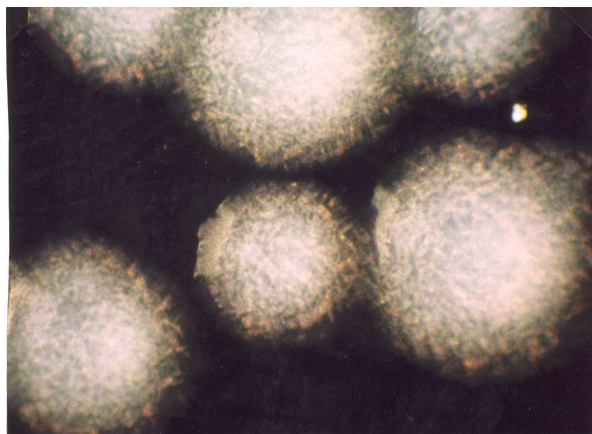


Figura 5 - Cultura de *L. pneumophila* em meio BCYE α com 72 horas de incubação. Observação do aspecto característico em “vidro moído” de algumas colónias observadas com lupa (ampliação 40x) [51].

1.5.2 - Detecção directa de antígenos

A técnica de imunofluorescência directa (IFD) permite a obtenção de resultados em duas a três horas. A sensibilidade da técnica varia entre 25 a 75% e a especificidade foi estimada em cerca de 95%. É um método rápido mas tecnicamente exigente, devendo ser efectuado por laboratórios experientes. Esta técnica permite a detecção da legionela nas secreções respiratórias, dias depois do início da terapia com agentes antimicrobianos. Problemas com a sensibilidade e especificidade desta técnica vieram limitar a sua utilização, sendo um resultado positivo por IFD considerado um diagnóstico provável [16, 24, 28, 49, 79].

1.5.3 - Detecção de antígenos na urina

A técnica de detecção de antígenos na urina por imunocromatografia é um método rápido e permite um diagnóstico precoce da DL (1 dia após o início dos sintomas). Para a detecção de antígenos de *L. pneumophila* sg1, os testes apresentam uma sensibilidade elevada (70 a 100%) e uma especificidade aproximada a 100%. A sensibilidade poderá

aumentar cerca de 20% concentrando a urina antes de executar o teste. É um diagnóstico confirmado. A maior desvantagem desta técnica é diagnosticar apenas *L. pneumophila* sg1 [16, 24, 58].

Actualmente a detecção de antígenos de legionela pode ser feita também por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [16, 24, 56].

1.5.4 - Diagnóstico serológico

A técnica de imunofluorescência indirecta (IFA- Indirect Immunofluorescence Assay) é a mais utilizada para a detecção de anticorpos no soro.

As serologias são mais úteis em estudos epidemiológicos do que para a decisão clínica individual, uma vez que têm a desvantagem de ser necessário duas determinações, uma na fase aguda e outra na fase de convalescença. A sensibilidade dos testes serológicos varia substancialmente entre os 41% e 94%. Dependendo do título de anticorpos, do serogrupo e do número de determinações, o diagnóstico poderá ser considerado um diagnóstico confirmado ou apenas provável. Assim, é diagnóstico confirmado se existir seroconversão para a *L. pneumophila* sg1 e o 2º título é igual ou superior a 128. É diagnóstico provável sempre que existir seroconversão para *L. pneumophila* não-sg1 ou outra para espécie, mesmo que o 2º título seja igual ou superior a 128, e sempre que só existir um título único igual ou superior a 256 [16, 24, 58].

A IFA foi utilizada para a detecção de anticorpos nos pacientes envolvidos no surto ocorrido em Philadelphia, em 1976, tendo sido de extrema importância na determinação da causa da doença [16, 28].

1.5.5 - Amplificação de ácidos nucleicos

A técnica de reacção em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) é, para além do método de cultura, uma das poucas metodologias com potencial para detectar infecções causadas por todas as espécies de *Legionella*, aumentando assim a

capacidade de diagnóstico da DL. É uma técnica específica mas não é mais sensível que o exame cultural, variando a sua sensibilidade entre o 30% e o 86%.

Têm sido desenvolvidas várias técnicas de PCR para legionela tendo como alvos os genes 16S rRNA, 23S-5S, 5S rRNA ou *mip* (específico de *L. pneumophila*). No entanto, a detecção de DNA de legionela em amostras respiratórias por PCR continua como um critério provável de diagnóstico de DL [16, 24, 28, 58].

Entre as vantagens da PCR contam-se a sua capacidade de detectar baixas concentrações de microrganismo, permitir um diagnóstico rápido e o resultado não ser influenciável pela antibioterapia prévia.

1.6 - Terapêutica

O atraso da instituição da terapêutica específica aumenta significativamente a mortalidade da doença. Actualmente as directrizes de tratamento empírico das pneumonias da comunidade incluem antibióticos com cobertura para *Legionella*. Historicamente o macrólido eritromicina era o fármaco de primeira linha para esta infecção, mas foi preterido face à intolerância gastrointestinal e ao facto de exigir uma dose elevada na administração endovenosa. Os novos macrólidos (preferencialmente a azitromicina, mas também a claritromicina) têm melhor actividade *in vitro* e melhor penetração intracelular e pulmonar. As fluoroquinolonas (levofloxacina) são também eficazes no tratamento da DL ao contrário dos aminoglicosídeos e antibióticos beta-lactâmicos [49, 51, 79].

1.7 - Controlo e Prevenção

Estudos epidemiológicos conduzidos desde 1976 demonstram que, em certos países da União Europeia, parte significativa do número total de casos de DL ocorre em indivíduos que viajam (no próprio país ou no estrangeiro) Os empreendimentos turísticos constituem, assim, elementos essenciais na compreensão do processo de

transmissão da doença, quer no que respeita à origem da fonte da infecção quer nas acções que visam a sua prevenção e controlo [43].

A doença tem ocorrido sob a forma de casos esporádicos ou de surtos epidémicos, em particular no Verão e Outono, com maior expressão em zonas turísticas [17, 43].

Os casos de DL podem surgir sob a forma de:

- **Caso isolado** - Caso relacionado com uma possível fonte de infecção, sem nenhum outro caso associado à mesma, nos dois anos anteriores ao início da doença.
- **Surto** - Dois ou mais casos de DL associados à mesma fonte de infecção, tendo os inícios da sintomatologia ocorrido num período inferior ou igual a dois anos.
- **Caso associado a viagens** - Caso que pernitou pelo menos uma noite fora de casa, no país de residência ou noutro, nos 15 dias anteriores ao início da doença. A associação da doença ao local de estadia só será definitiva após confirmação microbiológica.
- **Caso nosocomial** - Doente hospitalizado por um período superior ou igual a 15 dias, por motivo de outra doença, que adquire a DL. Os casos que iniciam sintomas até 15 dias após alta hospitalar também podem ter adquirido a infecção durante o internamento, pelo que se consideram possíveis casos nosocomiais.

A DL é, assim, uma pneumonia bacteriana grave que implica a adopção de medidas especiais de alerta e de intervenção junto dos potenciais focos infecciosos ambientais.

O primeiro caso de DL conhecido em Portugal foi publicado por Levi Guerra e colaboradores em 1981 [57]. Esta doença foi considerada Doença de Declaração Obrigatória (DDO) desde 1999 [20].

A partir de 2004, foi implementado o Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da DL. Considerou-se fundamental introduzir de forma sistemática a componente

laboratorial tendo em conta o baixo número de notificações clínicas, que se pensa não corresponder ao número real de casos de doença. A introdução da obrigatoriedade da notificação laboratorial foi uma tentativa para aumentar o número de casos conhecidos [18, 19, 20].

Portugal integrou desde 1986 o Grupo Europeu para o Estudo de Infecções por *Legionella*, *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI). A criação deste grupo teve como objectivo assegurar a vigilância da DL na Europa [25], em particular, no viajante.

Os membros do EWGLI eram cientistas que possuíam como objectivo comum o interesse no aumento do conhecimento e informação relativa aos aspectos microbiológicos e epidemiológicos (vertente clínica e ambiental) da DL [25].

O EWGLI constituía assim, o centro de informação e controlo epidemiológico, tendo como objectivos a vigilância ao nível dos países da União Europeia, em articulação com outros organismos internacionais. Também eram objectivo do grupo o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico e o tratamento. Um ano após a sua criação, foi estabelecida uma rede de vigilância europeia *European Surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease* (EWGLINET) e elaboradas umas *European Guidelines*. Todos os países que assinaram essas *Guidelines* ficaram obrigados aos procedimentos por elas definidos sempre que surge um caso de doença num viajante.

Desde Abril de 2010, a rede de vigilância passou a ser coordenada e gerida pelo *Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), em Estocolmo, Suécia, centralizando todos os relatórios de casos e as informações relacionadas com o regime de vigilância. A rede passou a designar-se por *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet) [25, 27].

1.8 - Expressão génica

A expressão génica refere-se ao processo de descodificação em proteína da informação codificada por um determinado gene. Teoricamente, a regulação em qualquer uma das

etapas desse processo pode levar a uma expressão génica diferencial. No estudo da expressão génica são utilizadas as técnicas de *Northern blot* e Hibridação *in situ* por Fluorescência. Estas técnicas, embora revolucionárias no momento da sua criação, são longas, envolvem protocolos que não possibilitam a análise simultânea de muitos transcritos e além disso, a quantidade de RNA necessária é grande [11, 35, 78].

A transcrição reversa, combinada com a PCR em tempo real, é actualmente o método de eleição para a análise quantitativa de mRNA. Apresenta uma elevada sensibilidade permitindo detectar pequenas variações na expressão genética, quantificar transcritos raros mesmo a nível do conteúdo de uma única célula. Para além disso, é fácil de realizar e produz quantificações fiáveis e exactas [47, 63, 78].

Para a análise da expressão génica em larga escala (por exemplo o genoma completo) a metodologia dos *Microarrays* é a mais utilizada [78].

1.9 - PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real é uma nova abordagem da técnica de PCR que permite controlar o progresso de amplificação enquanto este ocorre, isto é, em tempo real. Mais rápida, sensível, reprodutível e com o risco de contaminações minimizado, a técnica de PCR em tempo real permite ultrapassar a maior limitação da PCR convencional, a quantificação. A PCR em tempo real é adequada para uma vasta gama de aplicações como a análise da expressão génica, determinação de cargas virais, detecção de organismos geneticamente modificados e discriminação alélica [6, 23, 65, 68].

O desenvolvimento da PCR em tempo real deu-se em 1992, por Higuchi e colaboradores, que introduziram na reacção um marcador fluorescente (fluoróforo). Este ao liga-se ao produto formado revela a sua presença, a monitorização da emissão de fluorescência, durante a reacção, cujo aumento é proporcional à quantidade de produto formado, permite recolher dados durante todo o processo, por oposição à recolha apenas no final, típica da PCR convencional [45].

Denomina-se *Baseline* (Figura 6 - **a**) aos ciclos iniciais, quando o sinal é fraco e não pode ser diferenciado do ruído de fundo (*background*) (Figura 6 - **b**) que é referente à fluorescência inespecífica na reacção. Quando o produto formado se acumula, desenvolve-se um sinal que aumenta de forma exponencial (Figura 6 - **c**). Em condições ideais, a quantidade de produto amplificado aumenta na razão de um \log_{10} a cada 3,32 ciclos. Numa segunda fase, os componentes da reacção tornam-se limitantes, a disponibilidade de nucleótidos é diminuída, há acumulação de inibidores da reacção, perda da actividade da polimerase ou limitação da disponibilidade dos *primers* atingindo-se uma fase de transição ou linear (Figura 6 - **d**) podendo eventualmente atingir uma fase estacionária (*plateau*) (Figura 6 - **e**) [4, 6, 45, 48].

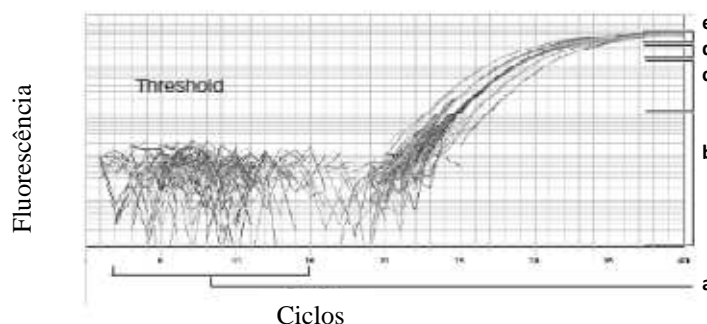


Figura 6 - Curva de amplificação padrão [41].

Na metodologia de PCR em tempo real são geradas curvas que se estabelecem paralelamente na fase exponencial e reflectem a diferença entre as quantidades iniciais de moléculas. Esta diferença pode ser observada e quantificada através da comparação entre o número de ciclos de amplificação necessários para que as amostras alcancem um nível crítico e gerarem um sinal de fluorescência detectável. Este número é registado e a este ciclo dá-se o nome de *threshold cycle* – *Ct* (ciclo no qual a curva de amplificação atravessa a linha de *threshold*) [45, 65].

Entende-se como *threshold* um valor ajustável (gerado automaticamente pelo *software* do equipamento ou inserido manualmente), que deverá situar-se acima do ruído de fundo e significativamente abaixo da fase de *plateau* da curva de amplificação [65].

1.9.1 - Detecção de produtos de PCR em tempo real

Os produtos de PCR em tempo real podem ser detectados usando corantes fluorescentes não específicos de DNA como o *SYBR green*, ou sondas específicas como as sondas *Taqman*, *Molecular beacons* e *FRET*. Os fluoróforos utilizados podem ter fluorescência intrínseca como a fluoresceína e rodamina, ou mudar de propriedades, como o *SYBR green* ao ligarem-se à molécula em estudo intercalando-se na dupla cadeia de DNA [45, 65].

1.9.1.1 - *SYBR green*

O *SYBR green* permite uma detecção sensível mas não específica, pois dá origem a um sinal de fluorescência na presença de qualquer molécula de DNA de cadeia dupla, incluindo dímeros formados por *primers* (Figura 7).

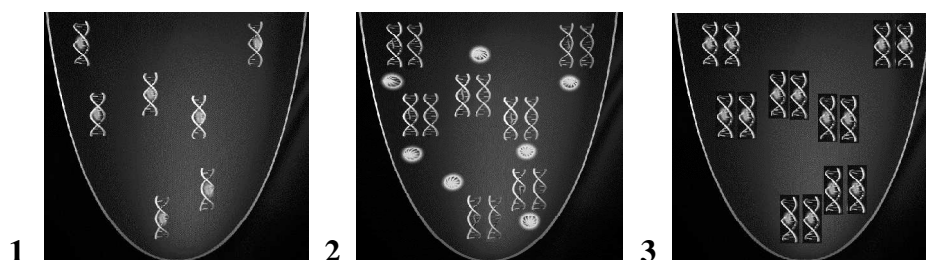


Figura 7 - *SYBR green* liga-se imediatamente a todas as cadeias duplas de DNA (1). Durante a PCR o DNA da sequência alvo é amplificado (2). O *SYBR green* em solução liga-se às novas cadeias duplas de DNA (3) [41].

A detecção da presença dos dímeros de *primers* pode ser efectuada através da análise da curva de dissociação. Esta análise é feita quando a reacção termina, representando uma medida da fluorescência em função da temperatura. A curva de dissociação permite visualizar o momento em que, devido ao aumento da temperatura, a dupla cadeia de DNA se separa e o corante é libertado, neste ponto a fluorescência diminui abruptamente. Esta temperatura é chamada temperatura de dissociação ou temperatura de *melting* – *T_m*. Como os dímeros de *primers* são tipicamente mais curtos e não completamente homólogos ao produto da reacção, dissociam-se a uma temperatura mais

baixa o que permite a sua fácil detecção ao analisar a curva de dissociação (Figura 8) [29, 41, 45].

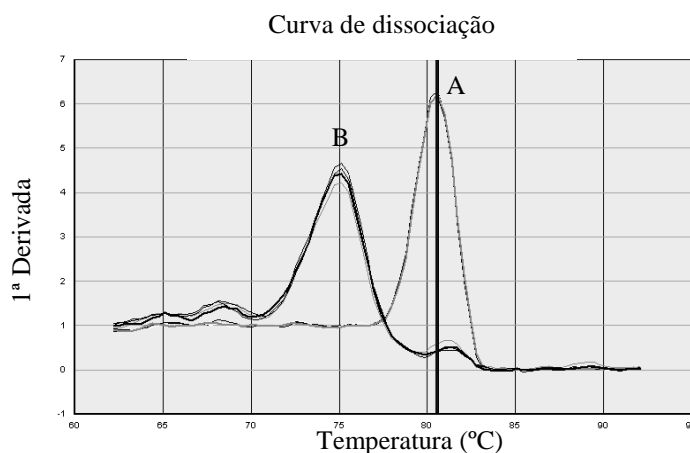


Figura 8 - Exemplo de curvas de dissociação. O produto específico (A) apresenta uma T_m de 80,5°C e os dímeros de *primer* (B) apresentam uma T_m caracteristicamente inferior de 75°C [41].

1.9.2 - Quantificação

Passada mais de uma década desde as primeiras publicações descrevendo a PCR em tempo real quantitativo, tem-se observado um crescimento no número de citações. Esta tecnologia tem sido otimizada de forma a melhorar a sua capacidade de quantificação [78].

A quantificação dos produtos PCR em tempo real pode ser feita de forma absoluta ou relativa. A primeira determina o número de cópias iniciais do fragmento de interesse, ao relacionar o sinal de PCR com uma curva padrão. Deve ser usada nas situações-em que a determinação absoluta do número de cópias do transcrito é necessária. A quantificação relativa descreve mudanças na expressão do gene alvo em relação a algum grupo de referência, como um controlo que não foi tratado ou uma amostra em tempo zero num estudo temporal [47, 65].

Na quantificação relativa é determinada a razão entre as quantidades do gene alvo e do gene de referência. O gene alvo e de referência são amplificados a partir de uma mesma amostra e o valor normalizado que é determinado é utilizado para comparar a expressão diferencial do gene. A correcta escolha do gene de referência é importante porque o

nível de expressão do gene de referência não deve variar em condições experimentais diferentes. O procedimento de quantificação difere, dependendo se o gene alvo e o gene de referência são amplificados com eficiências comparáveis ou diferentes. As eficiências de amplificação são comparáveis se o declive da recta resultante da diferença dos valores de C_t versus logaritmo da concentração for $<0,1$ [3, 5, 6, 11, 65].

O método de comparação dos C_t s ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) baseia-se no pressuposto de que as eficiências de amplificação do gene em estudo e do gene de referência são aproximadas. A equação baseia-se na diferença (ΔC_t) entre os valores de C_t do gene alvo e do normalizador e em seguida encontra-se a diferença entre o ΔC_t da amostra em estudo e da amostra calibradora. Por último, esses valores relativos são transformados em valores absolutos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Figura 9) [15, 63, 78].

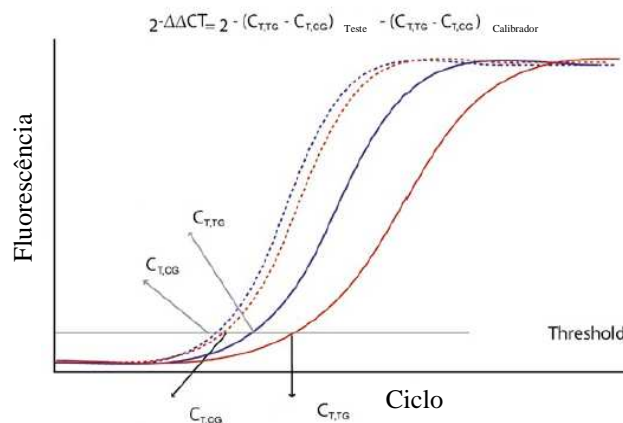


Figura 9 - Base do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [78].

1.9.3 - Gene de referência

Para a quantificação relativa da expressão génica, é importante escolher um gene adequado para usar como referência. O gene de referência é usado como controlo interno para normalizar os valores de mRNA. A expressão deste gene não deve variar. Como tal, geralmente é utilizado um gene “*housekeeping*”. É recomendável que o gene de referência seja devidamente validado para cada experiência a fim de garantir que a sua expressão não é afectada pelo tratamento experimental. A expressão do controlo endógeno deverá:

- Ser semelhante entre todas as amostras num dado estudo,
- Ser resistente a condições experimentais,
- Ser submetida a todos os passos da PCR em tempo real com a mesma cinética que o gene alvo [47, 78].

1.9.4 - Eficiência da reacção de PCR em tempo real

A eficiência da reacção pode ser estimada a partir de uma curva baseada em diluições seriadas de uma amostra padrão (pode ser um produto de PCR ou um plasmídeo que contém a sequência alvo) [45, 68].

Os valores dos *C_t*s das diluições são apresentados em relação ao logaritmo das concentrações das amostras, número de cópias da molécula alvo ou factor de diluição (Figura 10). A partir do declive (*S*) da recta resultante pode calcular-se a eficiência de amplificação (*E*) da reacção através da formula $E = 10^{(-1/S)} - 1$. Ao assumir-se uma certa eficiência, que idealmente aproxima-se do dobro do número de moléculas por ciclo, é possível calcular o número de moléculas de DNA da sequência amplificada que estava inicialmente presente na amostra [3, 5, 21, 45, 68].

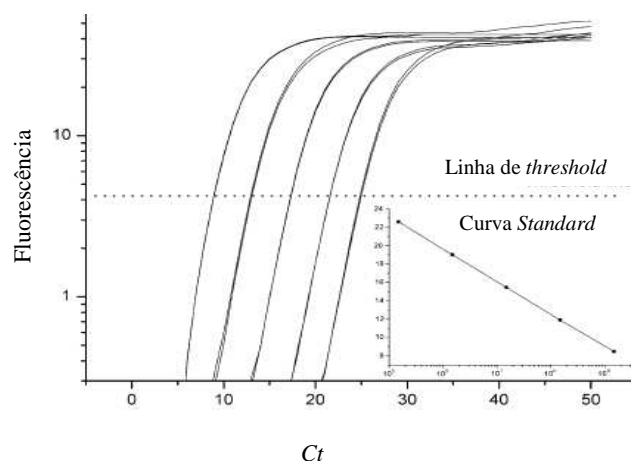


Figura 10 - Curva padrão da reacção de PCR em tempo real. As curvas representam cinco amostras padrão em escala logarítmica. Os pontos que interceptam o *threshold* são os valores de *C_t*. O gráfico à direita representa os valores de *C_t* versus o logaritmo do número inicial de cópias das amostras padrão [45].

O PCR em tempo real é tanto um processo termodinâmico como enzimático. O sucesso da PCR em tempo real requer amplificação e detecção em condições óptimas e cada componente de reacção pode afectar o resultado [65, 66].

1.10 – Objectivo do estudo

É actualmente claro que a legionela surge naturalmente em água doce como parasita de amibas, mas pode também replicar-se no interior de macrófagos alveolares. Estudos epidemiológicos, biológicos e genéticos indicam que a virulência da *L. pneumophila* em macrófagos alveolares é uma consequência da sua evolução como parasita de amibas. A replicação da legionela dentro das amibas não só permite aumentar o número de bactérias como também aumenta a sua resistência a agentes antimicrobianos, biocidas e parece potenciar a sua virulência [64, 73].

Como referido anteriormente, existem vários factores que contribuem para a virulência da *Legionella* como os sistemas de secreção do tipo tipo II e IV, os pili de tipo IV, flagelos e inúmeros outros ainda sob investigação [73].

O ciclo de vida da *L. pneumophila* em amibas assemelha-se fortemente ao observado em macrófagos. Espécies de amibas que vivem naturalmente em águas naturais e águas potáveis continuarão a ser uma fonte emergente de patogénios oportunistas de macrófagos [28, 36, 73].

O conhecimento da ecologia da legionela e a sua relação com as amibas como potenciadoras da sua virulência podem resultar numa informação preciosa para o combate ao aparecimento desses novos patogénios [73].

O presente projecto de investigação teve como principal objectivo o estudo da expressão génica da estirpe *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii*.

Foi proposto:

- Investigar e seleccionar genes críticos para a infecciosidade da *L. pneumophila*;
- Desenhar e optimizar a metodologia de PCR em tempo real para determinação da expressão génica dos genes alvo;
- Comparar o perfil de expressão génica da estirpe *Lp* Paris após cultura em *A. castellanii* com a mesma estirpe cultivada em meio líquido, de forma a avaliar o papel do protozoário-hospedeiro no ciclo de vida desta bactéria.

2 - Material e Métodos

Para atingir o objectivo proposto neste trabalho começámos por infectar culturas de *A. castellanii* com *Lp* Paris na fase estacionária. Vinte e cinco horas depois procedeu-se à recolha das legionelas que completaram um ciclo de infecção, isto é foram fagocitadas, multiplicaram-se no fagolisossoma e lisaram a *A. castellanii*.

Para o cálculo da expressão génica recorreu-se à técnica de PCR em tempo real e ao método de quantificação relativa. Como amostra calibradora utilizou-se a *Lp* Paris na fase estacionária.

A manipulação das culturas de *A. castellanii* bem como os ciclos de infecção foram realizados na sala de cultura de células, em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair).

Todos os procedimentos envolvidos na metodologia de PCR foram realizados em salas específicas: sala de extracção, sala de preparação de reagentes e sala de electroforeses.

Os métodos que seguidamente serão descritos, foram realizados tendo em conta as boas práticas laboratoriais, com materiais estéreis, livres de DNases e RNases e recorrendo a reagentes dedicados.

De modo a facilitar a esquematização dos métodos utilizados, estes serão apresentados em três grupos:

2.1 - Culturas

2.2 - Extracção de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

2.3- Estudo da expressão génica - Selecção dos genes alvo, desenho dos *primers* e PCR em tempo real

2.1 - Culturas

A *Legionella* apresenta um ciclo de vida bifásico, em culturas líquidas, sendo possível verificar que na fase exponencial exhibe traços replicativos e em fase estacionária expressa factores transmissivos. Estas alterações refletem profundas alterações na expressão génica.

No presente projecto foi determinante garantir que a *Lp* Paris utilizada no processo de infecção se encontrava na fase transmissiva (virulenta). Para nos certificarmos que as bactérias se encontravam uniformemente em fase estacionária, realizaram-se culturas líquidas.

2.1.1 - Cultura líquida de *Lp* Paris

Colocaram-se 100 ml de meio de extracto de levedura tamponado com ACES (AYE) (ver anexo 1) num *erlenmeyer* de 250 ml e inoculou-se com uma cultura pura de *Lp* Paris com 48 horas de crescimento em BCYE- α (ver anexo 2). Colocou-se a 37°C com agitação de 170 rotações por minuto (rpm) (agitador Medline 3000).

O crescimento da cultura líquida foi monitorizado pela leitura da densidade óptica (DO) a 550nm até atingir a fase estacionária (espectrofotómetro Shimadzu UV/1700).

A morfologia das bactérias foi confirmada através da observação ao microscópio óptico (Zeiss) com objectiva de 100x. A pureza da cultura líquida foi verificada semeando uma alíquota em BCYE- α e gelose de sangue.

2.1.2 - Cultura de *A. castellanii*

A cultura de *A. castellanii* (estirpe Neff ATCC 30010) foi efectuada em frascos de 25 cm², num meio com peptona, extracto de levedura e glucose (PYG), e realizou-se à temperatura ambiente (ver anexo 3).

2.1.3 - Ciclo de infecção em *A. castellanii*

Os ciclos de infecção foram realizados em culturas de *A. Castellanii* com 48h de crescimento em PYG, inoculando *Lp* Paris recolhida na fase estacionária, precoce e tardia, da curva de crescimento.

Considerou-se fase estacionária precoce, quando em leituras consecutivas, (intervalos de 1h), foi verificado um aumento da DO inferior a 0,050 e fase estacionária tardia quando em leituras consecutivas houve um decréscimo de DO.

Os ciclos de infecção foram realizados em frascos com *A. castellanii* em meio pobre em nutrientes (meio de infecção – MI) (ver anexo 4).

Para obter a suspensão bacteriana que se inoculou na cultura de *A. Castellanii* centrifugou-se 5 ml da cultura líquida de *Lp* Paris durante 15 minutos, 3000 x g a 4°C (Rotina 380R - Hettich). Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em MI de modo a obter uma suspensão com $1,53 \times 10^9$ *Lp* Paris/ml (DO_{550nm} = 1,2), valor previamente determinado no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas.

2.1.3.1 - Procedimento de infecção

Preparação da suspensão de *A. castellanii* para contagem: decantou-se o PYG dos frascos de cultura da *A. castellanii*, lavou-se a monocamada com meio MI, destacaram-se as amibas com o auxílio de um raspador. Efectuou-se a contagem em Câmara de Thomas, a fim de determinar o número de *A. castellanii*/ml.

Para cada frasco de infecção, pipetou-se o volume necessário para obter uma concentração de 40 a 80 x 10⁵ amibas e em seguida inoculou-se com a suspensão de *Lp* Paris de forma a obter uma proporção de 100 bactérias / amiba (*multiplicity of infection* (MOI) = 100) [9, 14]. Incubou-se 1 hora a 37°C e seguidamente lavou-se duas vezes com MI para remoção das bactérias extracelulares. Adicionou-se MI e incubou-se a 37°C durante 25 Horas.

Por cada ciclo de infecção realizou-se um controlo negativo – frasco de *A. castellanii* sem *Lp* Paris, para confirmar a ausência de contaminações.

2.2 - Extracção de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

As bactérias utilizadas na análise da expressão génica são recolhidas de culturas líquidas de *Lp* Paris na fase exponencial, fase estacionária (precoce e tardia) e após 25 horas de infecção em *A. castellanii*.

Para obter as bactérias da fase exponencial e da fase estacionária, centrifugou-se 5 ml da cultura líquida durante 5 minutos, 19300 x g a 4°C (Mikro 22R – Hettich). Decantou-se o sobrenadante e congelou-se o sedimento a -80°C.

Para obter as bactérias após 25h de infecção, recolheu-se todo o conteúdo dos frascos e colocou-se imediatamente em gelo. Centrifugou-se durante 5 minutos, 19300 x g a 4°C (Mikro 22R – Hettich). Rejeitou-se o sobrenadante e congelou-se o sedimento a -80°C.

2.2.1 - Extracção de RNA

O processo de extracção de RNA total fez-se com recurso ao *kit* comercial *InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit* – Invitex (ver anexo 5). Seguiu-se o protocolo do fabricante modificando os seguintes pontos:

- Substituição do Ditioneitol (DTT) por β -Mercaptoetanol (ponto 3);
- Adição do procedimento de centrifugação antes da eluição do RNA para eliminar completamente algum resíduo de solução de lavagem (ponto 21);
- Repetição da eluição (pontos 27,28 e 29).

A eficácia da extracção foi confirmada por electroforese em gel de agarose 1,5% (ver anexo 6) e a quantificação foi efectuada a 260nm no espectrofotómetro (Biotech Photometer UV/1101).

2.2.2 - Tratamento com DNase

Tratou-se o extracto de RNA total com DNase recorrendo ao *kit* comercial *Turbo DNA-Free™ Kit* - Ambion (ver anexo 7) para remover a contaminação de DNA genómico. Tal como o protocolo de extracção, este protocolo sofreu pequenas modificações em relação à bula do produto a fim de garantir um melhor resultado.

Os pontos de optimização foram:

- Triplicação do volume de DNase recomendado pelo fabricante, realizando 2 ciclos de incubação de 30 minutos com volumes de 1,5µl (pontos 1 a 4);
- Aumento do tempo de incubação para 10 minutos após adição do reagente de inactivação (ponto 6).

2.2.3 - Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada recorrendo a um *hexaprimer* (Roche), dNTP's (Invitrogen) e ao *kit* comercial *SuperScript III* – Invitrogen. O protocolo utilizado foi o aconselhado pelo fabricante (ver anexo 8).

2.2.4 - Avaliação da eficácia relativamente aos pontos 2.2.2 e 2.2.3

Para avaliar a eficácia do tratamento com DNase e da síntese de cDNA, por cada sessão de trabalho, realizou-se um PCR usando *primers* específicos para o gene *mip* segundo o protocolo - [Sequence-Based Typing \(SBT\) protocol for epidemiological typing of Legionella pneumophila \(Version 4.2\)](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php), disponível na internet em: http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php [26, 54]

Na PCR utilizaram-se como amostras o RNA total tratado com DNase e o cDNA. Como controlo positivo o DNA de *Lp* Paris (extraído com o *kit* comercial *InstaGene™ Matrix* (Bio-Rad)).

2.3 - Estudo da expressão génica

2.3.1 - Selecção dos genes alvo

Utilizaram-se os resultados de *Microarrays* (ver anexo 9) (técnica anteriormente efectuada na “*Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires do Departement de Génomes et Génétique, Institut Pasteur de Paris*”), obtidos por Maria de Jesus Chasqueira, (tese de doutoramento em preparação) para seleccionar os genes alvo e o controlo endógeno a utilizar no presente trabalho.

Foram seleccionados nove genes de entre os 123 genes que se revelaram induzidos e sete de entre os 236 genes que se revelaram reprimidos (só foram consideradas genes induzidos ou reprimidos os que apresentaram variações de expressão iguais ou superiores a duas vezes). Como controlo endógeno foi seleccionado o gene *gyraseA* (*gyrA*) por não apresentar variação de expressão [9].

Tabela 3 - Genes seleccionados (induzidos e reprimidos) e respectiva função

INDUZIDOS	GENES	Função	REPRIMIDOS	GENES	Função
	<i>lpp1316</i>	Proteína LspG (Via secretória do tipo II)		<i>lpp1177</i>	Sem função conhecida
	<i>lpp1330</i>	Sem função conhecida		<i>lpp1293</i>	Sem função conhecida
	<i>lpp2607</i>	Sem função conhecida		<i>lpp1340</i>	Sem função conhecida
	<i>lpp0094</i>	Sem função conhecida		<i>lpp1900</i>	Sem função conhecida
	<i>lpp1612a</i>	Similar ao N-terminal da proteína SidB		<i>lpp0972</i>	Similar à proteína EnhA
	<i>lpp1612b</i>	Parte C-terminal da proteína SidB		<i>lpp1170</i>	Proteína regulatória (Domínios GGDEF e EAL)
	<i>lpp0845</i>	Regulador global de CsrA		<i>lpp2694</i>	Proteína EnhA

	<i>lpp1315</i>	Proteína LspH (Via secretória do tipo II)		
	<i>lpp2092</i>	Proteína SdeC (substracto do sistema <i>Dot/Icm</i>)		

2.3.2 - Desenho dos *primers*

O desenho dos *primers* foi realizado com recurso ao programa *Primer Express* Versão 3.0 existente no *software* do equipamento *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* utilizando as seguintes condições (Figura 11):

Parameter	Value
<input type="checkbox"/> Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<input type="checkbox"/> Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
<input type="checkbox"/> Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<input type="checkbox"/> Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
<input type="checkbox"/> Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
<input type="checkbox"/> Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<input type="checkbox"/> Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
<input type="checkbox"/> Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
<input type="checkbox"/> Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	<input checked="" type="checkbox"/>
Select Probe with more C's than G's	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
<input type="checkbox"/> Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	140
Max Amplified Region Length	300
<input type="checkbox"/> General	
Max Primers / Probes	50

Figura 11 - Parâmetros definidos no *Primer Express* 3.0

Das várias hipóteses de pares de *primers* gerados pelo programa, foram seleccionados os que satisfizeram o maior número de parâmetros definidos.

Após essa selecção, foi estudada a especificidade teórica dos *primers* com recurso ao programa *basic local alignment search tool* (BLAST) através da ligação: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> utilizando o genoma completo da *Lp* Paris (Subject ID - gi|54295983|ref|NC_006368.1) (Figura 12)

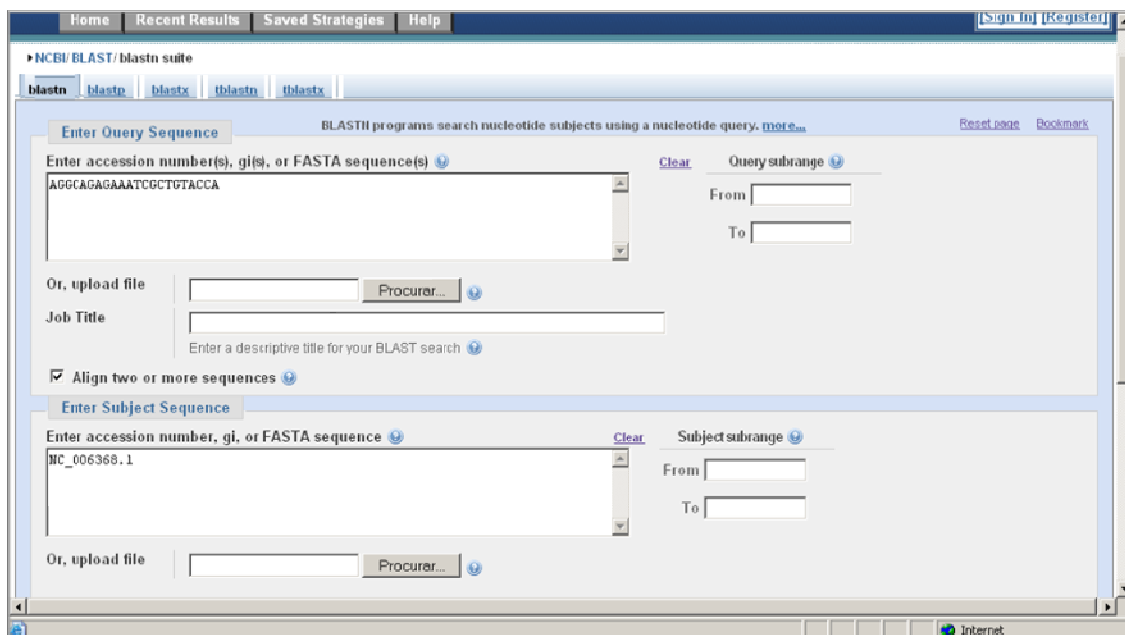


Figura 12 - Página *blastn* - Exemplo

Os critérios utilizados durante esta análise foram:

- O primer só apresentar 100% de homologia com o gene alvo;
- O *primer* não apresentar homologias superiores a 50% do seu tamanho na região 3'.

Numa segunda fase, os *primers* seleccionados foram submetidos a nova avaliação com recurso ao programa *Gene Runner* Versão 3.01 (Figura 13).

Nesta avaliação foram analisadas as possibilidades de formação de estruturas secundárias (*Dimers*; *Hairpin*; *Internal loops*; *Bulge loops*) intramoleculares e intermoleculares entre cadeias de *primers Forward* (F) e cadeias de *primers Reverse* (R). Foram também analisados os valores de energia livre (dG) das ligações formadas.

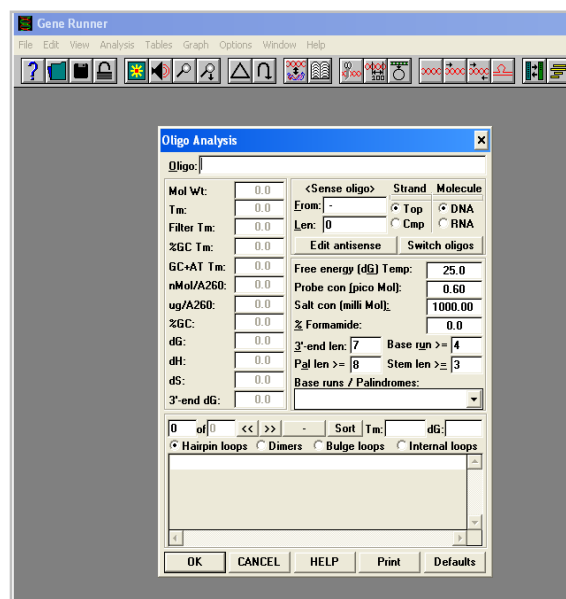


Figura 13 - Página principal do programa *Gene Runner* para análise de oligonucleotídeos.

Os *primers* seleccionados após esta análise foram novamente submetidos ao BLASTN, agora para avaliar possíveis homologias teóricas com o genoma completo da *A. castellanii* (Subject ID - gi|11467047|ref|NC_001637.1|).

A especificidade analítica dos *primers* será referida com detalhe no ponto 2.3.5.

2.3.3 - PCR em tempo real

O estudo da expressão génica foi realizado no *ABI PRISM – Applied Biosystems, 7000 Sequence Detection System* usando *SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* segundo indicações do fabricante. (Foi utilizado o aparelho existente no Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular, Hospital Egas Moniz – CHLO, devido a avaria do aparelho existente na FCM).

As reacções de PCR foram efectuadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems*) com volume final de reacção de 20µl. O programa de amplificação usado foi o *standard*, cujos parâmetros estão descritos na figura 14, ao qual se associou a curva de dissociação.

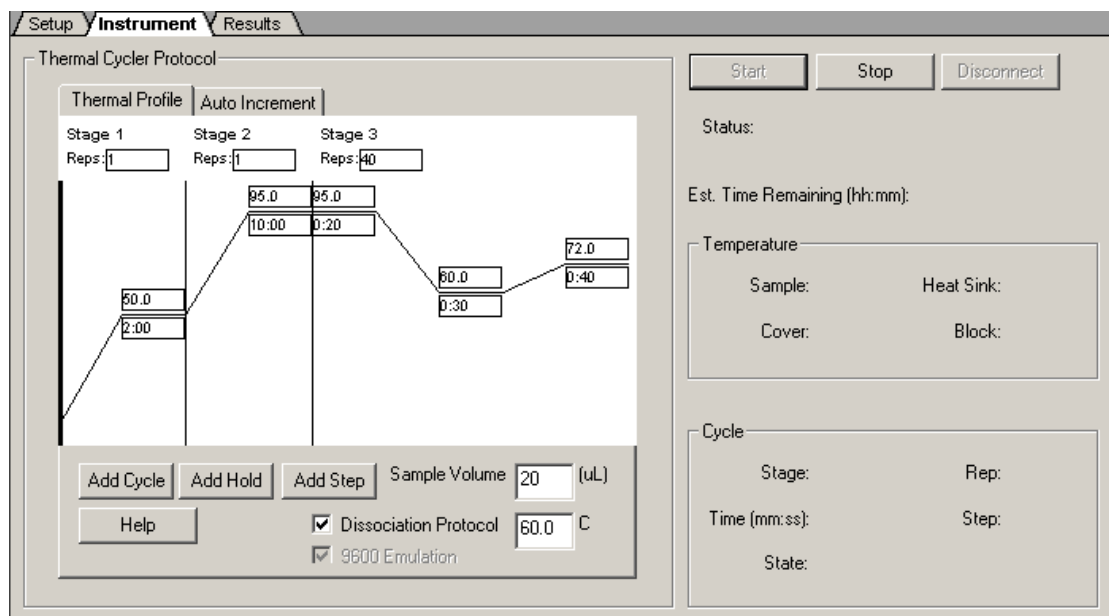


Figura - 14 - Programa de PCR tempo real.

A composição da mistura de reacção utilizada foi:

- 10 µl *SYBER Green PCR Master Mix*
- 2 µl *primer F* (concentração alvo de optimização)
- 2 µl *primer R* (concentração alvo de optimização)
- X µl amostra (X alvo de optimização)
- Água ultra pura livre de DNases e RNases (volume necessário para perfazer 20 µl)

Em cada sessão de PCR foi efectuado um branco por cada par de *primers* e todas as amostras foram realizadas em duplicado.

A avaliação da especificidade analítica dos produtos de amplificação foi efectuada através da análise da curva de dissociação (formação de um pico único com a *Tm* esperada) e da visualização dos fragmentos formados em gel de agarose 1,5% (ver anexo 6).

2.3.4 - Optimização da concentração de *primers*

Para a optimização da concentração de *primers* foram testadas as concentrações de 0,2 e 0,4 μ M. Utilizaram-se os *primers* gyrA e lpp1316 e o DNA de *Lp* Paris nas concentrações de 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 ng/ μ l.

2.3.5 - Avaliação da especificidade dos *primers*

A avaliação da especificidade dos *primers* foi realizada utilizando os DNAs de *Lp* Paris e de *A. castellanii* com a concentração de 5ng/ μ l.

O DNA da *A. castellanii* foi extraído com o *kit* comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen).

2.3.6 - Avaliação da sensibilidade dos *primers*

A avaliação da sensibilidade dos *primers* foi realizada utilizando DNA de *Lp* Paris nas concentrações de 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 ng/ μ l (esta ultima concentração é equivalente a uma unidade de genoma da *Lp* Paris).

2.3.7 - Optimização do volume de amostra

Para a optimização do volume de amostra foram testados os volumes de 2 e 4 μ l, utilizou-se cDNA e os *primers* gyrA, lpp1330 e lpp1900.

Na análise dos resultados dos pontos 3.4 e 3.7 utilizou-se o critério do menor valor de *Ct* [31]

2.3.8 - Avaliação da reprodutibilidade intra e inter-ensaio

A avaliação da reprodutibilidade intra-ensaio foi realizada em triplicado, com recurso a amostras de DNA e cDNA de *Lp* Paris, utilizando os *primers* gyrA, lpp1612b, lpp0972, lpp1900, lpp1330 e lpp1316.

A avaliação da reprodutibilidade inter-ensaio foi realizada em três ensaios diferentes. Utilizou-se uma *pool* de cDNA com as seguintes diluições: puro, 1/50; 1/100 e 1/1000 e os *primers* *gyrA* e *lpp1316*. Cada uma destas concentrações foi sempre analisada em triplicado.

O cálculo do coeficiente de variação foi efectuado através da equação $c_v = \sigma/\mu$.

2.3.9 – Estudo da linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada utilizando os *primers* *gyrA* e *lpp1316* e uma *pool* de cDNA com as seguintes diluições: puro; 1/100 e 1/1000

2.3.10 – Estudo da eficiência da técnica de PCR em tempo real

O estudo da eficiência envolveu a realização de PCR em tempo real em diluições seriadas de DNA de *Lp* Paris (5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0005, 0,00005, 0,000005 ng/ μ l) e posterior aplicação de uma regressão linear à relação entre as observações das variáveis **y** (*Ct*) *versus* **x** (Log das concentrações de DNA em ng).

O cálculo da eficiência do PCR foi efectuado utilizando o declive da recta obtida na regressão linear, através da equação $E = ([10^{(-1/\text{declive})}] - 1) * 100$ [21, 62, 68].

2.3.11 – Cálculo da expressão génica e análise de resultados

O cálculo da expressão génica foi realizado recorrendo ao método $2^{-\Delta\Delta CT}$ que permite a quantificação relativa através de medições de *Ct* [63, 78].

Os resultados dos genes em estudo foram normalizados com os resultados do gene de referência (*gyrA*). O cálculo da expressão relativa de cada gene foi efectuado entre a expressão do gene alvo na amostra em análise (*Lp* Paris após 25 horas de infecção em

A.castellanii) e a sua expressão na amostra calibradora (*Lp* Paris na fase estacionária - precoce ou tardia) utilizando a seguinte formula:

$$\Delta\Delta CT = [(Ct_{(GA\ 25h)} - Ct_{(Ggyr\ 25h)}) - (Ct_{(GA\ 0h)} - Ct_{(Ggyr\ 0h)})]$$

GA 0h = gene alvo amostra calibradora (*Lp* Paris na fase estacionária -precoce ou tardia)

Ggyr 0h = gene *gyrA* amostra calibradora (*Lp* Paris na fase estacionária -precoce ou tardia)

GA 25h = gene alvo na amostra em análise (*Lp* Paris após 25 horas de infecção em *A.castellanii*)

Ggyr 25h = gene *gyrA* na amostra em análise (*Lp* Paris após 25 horas de infecção em *A.castellanii*)

Nesta fórmula um resultado negativo indica uma diminuição de expressão do gene nas condições em estudo e um resultado positivo indica um aumento de expressão.

De forma a transformar este resultado no número de vezes de variação de expressão (V) usou-se a seguinte fórmula: $V = (2 \times \text{eficiência})^{\Delta\Delta CT}$

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabendo que o ciclo de vida bifásico da *L. pneumophila in vitro* se traduz em profundas mudanças de expressão génica [57] propusemo-nos identificar e estudar neste projecto as alterações de expressão génica após co-cultura em *A. Castellanii*, hospedeiro natural da legionela. Após optimização da metodologia a usar foram realizadas duas réplicas biológicas.

3.1 - Culturas da *Lp* Paris e ciclos de infecção em *A. castellanii*

As culturas líquidas de *Lp* Paris foram monitorizadas por espectrofotometria, garantindo que os ciclos de infecção em *A. castellanii* seriam efectuados com legionelas na fase virulenta (fase estacionária).

Tabela 4 – Exemplo de monitorização de uma cultura líquida de *Lp* Paris à DO_{550nm}

Tempo	Curva
0h	0,077
04h	0,125
12h	1,692
21h	3,290
22h	3,620
24h	3,640
25h	3,592

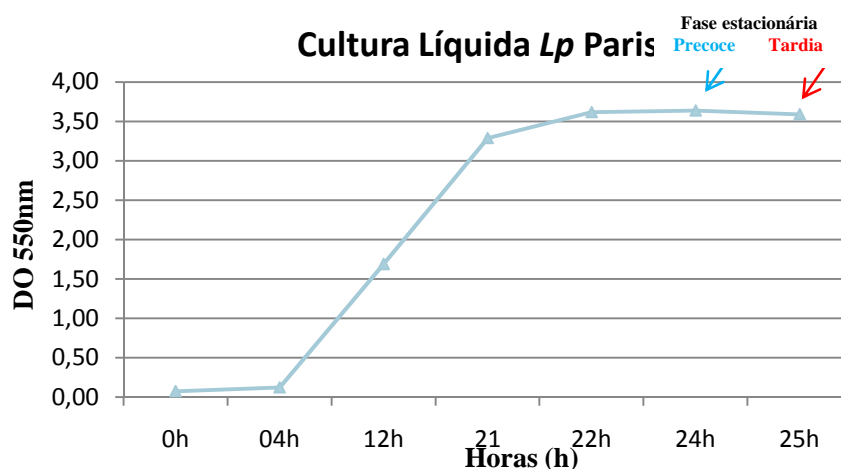


Figura 15 – Exemplo de gráfico de uma cultura líquida de *Lp* Paris

As culturas de *Lp* Paris nas condições ensaiadas e com o inóculo utilizado, apresentaram uma fase exponencial entre as 4 e as 21 horas de cultura, uma fase estacionária precoce aproximadamente às 24h e uma fase tardia aproximadamente às 25h.

Para avaliar se a expressão génica da *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* era ou não dependente da fase de crescimento da cultura bacteriana, utilizaram-se nos nossos ensaios de infecção, inóculos de *Lp* Paris recolhidos em dois pontos da fase estacionária, um no início e outro antes da fase de declínio do crescimento. A análise da expressão génica nestes dois pontos pareceu-nos pertinente visto até à data deste projecto não haver estudos que tenham averiguado esta temática.

Confirmando estudos já publicados [9, 12, 57] a *Lp*. Paris, nas nossas culturas líquidas, passou da forma não móvel (fase exponencial – não virulenta), para a forma móvel (fase estacionária- virulenta) - observação ao microscópio óptico (100X).

A fim de potenciar a fagocitose da *Lp* Paris pela *A. castellanii* realizaram-se os ciclos de infecção em meio pobre em nutrientes (MI). O tempo de contacto escolhido, entre bactérias e amibas, foi de 1h. Como se pretendia obter uma suspensão final muito concentrada em bactérias aptou-se por um “MOI” de 100 [14, 9]. Dado que no final da infecção se pretendia obter uma suspensão de bactérias composta por bactérias oriundas da multiplicação intracelular, isto é, provenientes exclusivamente do ciclo de infecção, tivemos especial atenção às lavagens após a fagocitose. Assim, no final da fagocitose foram efectuadas várias lavagens, em média três, para eliminar todas as bactérias que não foram fagocitadas.

Verificou-se que 25 horas de incubação a 37°C foi o tempo necessário para que 90% das amibas infectadas fossem lisadas e se verificasse a libertação das bactérias que se multiplicaram intracelularmente. A recolha destas legionelas em gelo, assegurou a paragem imediata do metabolismo celular, ponto importante neste caso em que se pretendeu analisar a expressão génica das bactérias logo após a lise das amibas.

Como se pode observar na figura 16, algumas das amibas em MI após 25h apresentam alteração na aderência e na morfologia, com perda de conteúdo intracelular e passagem à forma esférica, no entanto, não se observou lise celular (A e B). Uma hora após a inoculação com *Lp* Paris (“MOI” = 100) a morfologia da *A. castellanii* manteve-se idêntica à do controlo negativo (C e A), mas após as 25h cerca de 90% das amibas infectadas encontravam-se lisadas (D).

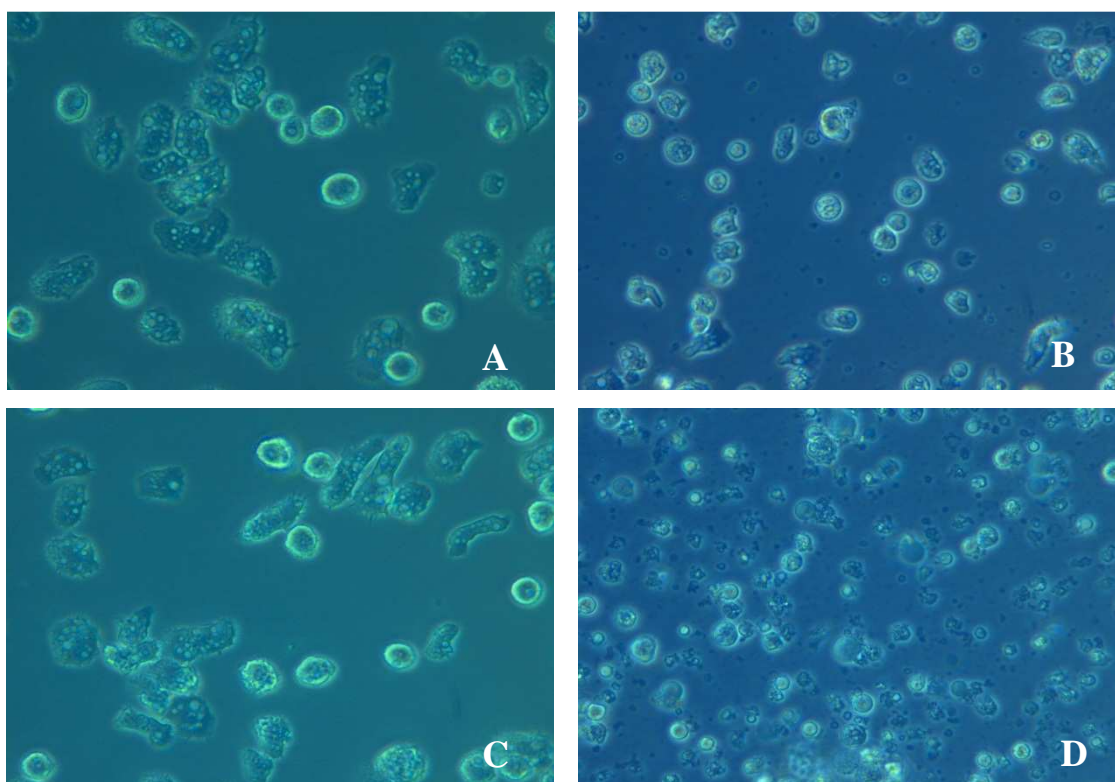


Figura 16 – Morfologia de *A. castellanii* em meio MI observada em microscópio invertido (40x). Controlo Negativo no início (A) e no fim do ciclo de infecção (25h) (B). Morfologia de *A. castellanii* infectada com *Lp* Paris no início (1h) (C) e no fim do ciclo de infecção (25h) (D).

3.2 - Extracção de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

Após a extracção do RNA, a qualidade do extracto foi verificada por separação electroforética em gel de agarose 1,5% (figura 17) tendo-se verificado a presença das bandas referentes ao 23S e ao 16S [69].

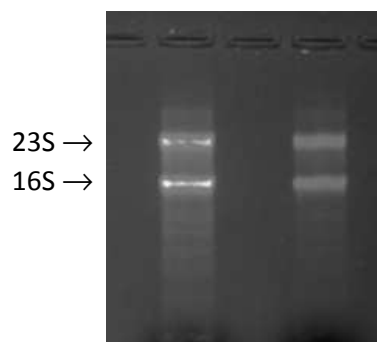


Figura 17 - Exemplo de dois extractos de RNA total

A extração de RNA foi realizada com recurso a um kit comercial que mostrou ter baixo rendimento mesmo após optimização. Este baixo rendimento refletiu-se especialmente nas suspensões após co-cultura, onde a maior concentração de RNA obtida foi de 22,44µg/ml, obrigando na maioria dos extractos, ao uso do volume máximo admissível para o tratamento com DNase (15µl) limitando a quantidade de cDNA disponível para os ensaios de PCR em tempo real.

As PCR convencionais (gene *mip*) realizadas nas amostras de RNA tratadas, permitiram a confirmação da ausência DNA genómico contaminante e a verificação da eficácia da transcrição reversa, validando os cDNA para o estudo da expressão génica. Na figura 18 é apresentado um exemplo dos produtos de amplificação obtidos para o gene *mip* após a PCR.

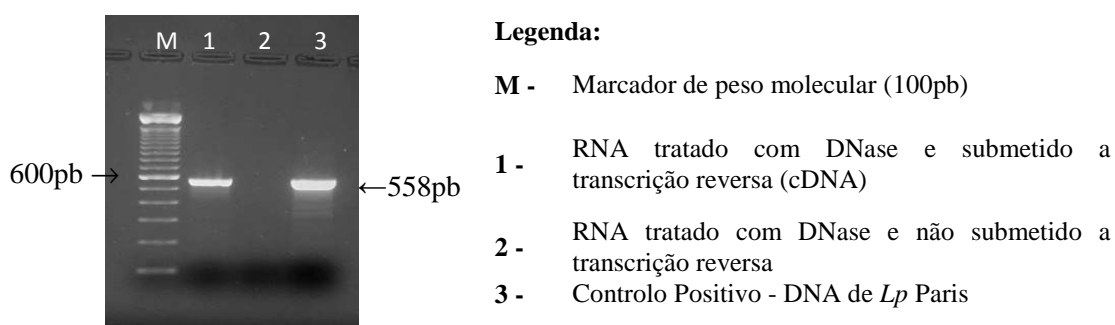


Figura 18 – Electroforese em gel de agarose a 1,5%, dos fragmentos obtidos após PCR para o gene *mip* (558pb)

Através da observação da figura 18 podemos visualizar nos poços 1 e 3 as bandas referentes a um fragmento de 558pb correspondente ao gene *mip* [54]. No poço 2, a ausência de banda confirma a ausência de contaminação com DNA genómico nas amostras tratadas com a DNase.

3.3 - Estudo da expressão génica

3.3.1 - Selecção dos genes alvo

Foram seleccionados 16 genes (referidos anteriormente, Tabela 3 - Material e Métodos), sete dos quais sem função conhecida à data da realização deste projecto.

3.3.2 – Desenho, selecção e estudo da especificidade teórica dos *primers*

Para permitir a análise simultânea do maior número de genes na mesma sessão de PCR em tempo real, estabeleceu-se que na fase de desenho e selecção dos *primers* as condições e critérios a utilizar seriam idênticos para todos eles.

Para o desenho dos *primers* as condições foram: $T_m = 60 \pm 2^\circ\text{C}$, comprimento de 20 a 40 bases, conteúdo de GC entre 30 e 80%, formação de um produto PCR único (entre 140 e 300 pb) e sem sequências consecutivas de nucleótidos repetidos.

Dos inúmeros *primers* gerados pelo *Software* para os 16 genes em estudo, foram seleccionados **188 *primers*** que satisfizeram as condições impostas na fase de desenho. Todos estes *primers* foram analisados quanto à sua **especificidade teórica** para o genoma da *Lp* Paris, utilizando o BLAST. Esta análise confirmou a homologia única do *primer* para o gene alvo (100%) tendo sido rejeitados todos os pares de *primers* que apresentaram homologias superiores a 50% do seu tamanho noutras regiões do genoma que não o gene alvo, bem como os *primers* que apresentavam mais de cinco ligações na região 3`.

Exemplo de resultados da análise da especificidade teórica:

BLAST para um *primer* seleccionado:

Informação do gene no blastn:

Gene	<i>lpp0845</i>	- "gi 54295983:947459-947668	Legionella	pneumophila
		str.Paris"		

Par de *primers* gerado pelo *Primer Express* (versão 3.0):

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq
1	20	42	23	59	43	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT	187	163	25	58	36	CAGATTCTTTTCTTGTGTATGCG

BLAST para o *primer* F:

Score = 46.1 bits (23), Expect = 5e-07	
Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)	
Strand=Plus/Plus	
Query 1	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT 23
Sbjct 947478	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT 947500(NO GENE PRETENDIDO)

BLAST para o *primer* R:

Score = 50.1 bits (25), Expect = 4e-08	
Identities = 25/25 (100%), Gaps = 0/25 (0%)	
Strand=Plus/Minus	
Query 1	CAGATTCTTTTCTTGTGTATGCG 25
Sbjct 947645	CAGATTCTTTTCTTGTGTATGCG 947621(NO GENE PRETENDIDO)

Estes *primers* apresentaram ligação com 100% de homologia apenas no gene pretendido, não tinham homologias superiores a 50% noutras zonas do genoma da *Lp* Paris e por isso foram seleccionados.

BLAST para um *primer* rejeitado:

Informação do gene no blastn:

Gene	<i>lpp2092</i>	- "SdeC protein, substrate of the Dot/Icm system - 4.62kb
		>gi 54295983:2372412-2377026 Legionella pneumophila str.Paris"

Par de *primers* gerado pelo *Primer Express* (versão 3.0):

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq
25	548	565	18	58	61	GATCCCAACCTGATGCG	692	672	21	58	57	GCTTGGGAGCTACTTGTGGTG

BLAST para o *primer* F:

```
Score = 36.2 bits (18), Expect = 3e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1      GATCCCCAACCTGATGCG 18
          |||||
Sbjct 2372959 GATCCCCAACCTGATGCG 2372976 (NO GENE PRETENDIDO)
```

```
Score = 36.2 bits (18), Expect = 3e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1      GATCCCCAACCTGATGCG 18
          |||||
Sbjct 2334587 GATCCCCAACCTGATGCG 2334570 (FORA DO GENE PRETENDIDO)
```

```
Score = 36.2 bits (18), Expect = 3e-04
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1      GATCCCCAACCTGATGCG 18
          |||||
Sbjct 2381852 GATCCCCAACCTGATGCG 2381869 (FORA DO GENE PRETENDIDO)
```

Este *primer* apresentou ligação com 100% de homologia em três locais diferentes no genoma da *Lp* Paris e por isso foi rejeitado.

Os genes *lpp2092* (induzido) e *lpp1293* (reprimido) foram eliminados por não ter sido possível desenhar um par de *primers* que respondesse aos requisitos apresentados anteriormente. Assim, estes genes não foram alvo de estudo da expressão génica.

Numa segunda fase, os **36 pares de *primers*** selecionados no processo anterior, isto é, passaram a análise da especificidade teórica, foram avaliados sobre as possibilidades de formação de estruturas secundárias, intramoleculares (F↔F e R↔R) e intermoleculares (F↔R): *Hairpin*, *Dímers*; *Internal loops*; *Bulge loops* (os *Internal loops* e *Bulge loops* são variações dos Dímeros), com recurso ao programa *Gene Runner* Versão 3.01. Foram também analisados os valores de dG das ligações formadas, onde o valor de G mede a estabilidade da ligação. Assim, quanto menor o valor de dG mais estável é o *duplex* formado pelo oligonucleotido.

Nas análises apresentadas nos exemplos seguintes só são referidas as estruturas consideradas relevantes (valores de dG negativos). As barras verticais (|) indicam as

bases em complementaridade contínua e os sinais “+” indicam outros pares de bases complementares.

Exemplo de um par de *primers* seleccionado:

Informação do gene:

Gene *lpp0845* - "csrA - gi|54295983:947459-947668 *Legionella pneumophila* str.Paris"

Par de *primers* gerado pelo *Primer Express* (versão 3.0):

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq
1	20	42	23	59	43	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT	187	163	25	58	36	CAGATTCTTTTCTTGTGTATGCG

Primer F - TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT

Primer R - CAGATTCTTTTCTTGTGTATGCG

Gene Runner para o *primer F*

Dimers uma estrutura com valores positivos de dG

Gene Runner para o *primer R*

Hairpin uma estrutura com valores positivos de dG

Dimers quatro estruturas com valores positivos de dG

Internal loops uma estrutura com valores positivos de dG

Gene Runner para os *primers F↔R*

Dimers uma estrutura com valores positivos de dG

Apesar de apresentar a possibilidade de formação de algumas estruturas secundárias, todas elas apresentaram baixa estabilidade (valores de dG positivos), permitindo a selecção deste par de *primers*.

Exemplo de um par de *primers* rejeitado nesta fase:

Informação do gene:

Gene *lpp1330* -"hypothetical protein >gi|54295983:1485268-1486245
Legionella pneumophila str. Paris"

Par de *primers* gerado pelo *Primer Express* (versão 3.0):

#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq
41	800	819	20	58	50	ATAAAGGTCGCGGTGATCGT	949	931	19	58	63	CCAGTGTAGCGCGCTCTTC

Primer F - ATAAAGGTCGCGGTGATCGT

Primer F - CCAGTGTAGCGCGCTCTTC

Gene Runner para o primer F

Dimers:

5' ATAAAGGTCGCGGTGATCGT 3' SENSE
+ + |||| + +
3' TGCTAGTGGCGCTGGAAATA 5' SENSE
STACK AT 9 IS 4 BP LONG.

Gene Runner para o primer R

Dimers:

5' CCAGTGTAGCGCGCTCTTC 3' ANTISENSE
+ ||||| +
3' CTTCTCGCGCGATGTGACC 5' ANTISENSE
STACK AT 8 IS 8 BP LONG.

Gene Runner para os primers F↔R

Dimers:

5' ATAAAGGTCGCGGTGATCGT 3' SENSE
+++ |||| + +
3' CTTCTCGCGCGATGTGACC 5' ANTISENSE
STACK AT 9 IS 4 BP LONG.

Bulge loops

5' ATAAAGGTCGCGGTGATCGT 3' SENSE
||| ||| +
3' CTTCTCGCGCGATGTGACC 5' ANTISENSE
STACK AT 4 IS 7 BP LONG.

Internal loops

5' ATAAAGGTCGCGGTGATCGT 3' SENSE
||| |||| + +
3' CTTCTCGCGCGATGTGACC 5' ANTISENSE
STACK AT 4 IS 9 BP LONG.

Por apresentar várias estruturas secundárias com elevada estabilidade este par de *primers* foi rejeitado.

Nesta fase foram rejeitadas todas as hipóteses de pares de *primers* que apresentaram elevado número de ligações (intramoleculares e intermoleculares), tendo sido escolhidos os **14 pares de *primers*** (um par por cada gene em estudo) que apresentaram o menor número de estruturas secundárias e com valores de dG mais elevados.

Por último, recorrendo ao BLASTN, verificou-se se os pares de *primers* seleccionados após estas duas fases, apresentavam alguma homologia teórica com o genoma da *A. castellanii*. Este passo permitiu verificar se os *primers* seleccionados não se ligavam a este microrganismo validando-os para o estudo da expressão génica. Pretendia-se ter a certeza de que os resultados obtidos no PCR em tempo real seriam única e exclusivamente referentes à amplificação dos genes da legionela.

Nenhum par de *primers* apresentou homologia teórica com genoma da *A. castellanii*.

Na tabela 5 são apresentados os 14 pares de *primers* que após as análises anteriores, foram seleccionados para estudo da expressão génica:

Tabela 5 – Lista dos genes seleccionados: gene, posição do gene alvo no genoma da *Lp* Paris (Subject ID - gi|54295983|ref|NC_006368.1), nome do *primer*, respectiva sequência nucleotídica, zona de 100% de homologia e tamanho do fragmento formado (amplicão).

	Gene	Posição do Gene	Nome <i>Primer</i>	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Posição do <i>primer</i>	Amplicão
INDUZIDOS	<i>lpp0094</i>	97375-98142	<i>lpp0094</i> - F	TAATCCTCTGGTGGGCTCGA	97449 - 97468	158pb
			<i>lpp0094</i> - R	TTCCACATCGGTGATACGAAC	97606 - 97585	
	<i>lpp0845</i>	947459-947668	<i>lpp0845</i> - F	TGATTTTGACTCGGCGTATAGGT	947478 - 947500	165pb
			<i>lpp0845</i> - R	CAGATTCTTTTCTTGTTGTATGCG	947645 - 947621	
	<i>lpp1315</i>	c1469180-1468695	<i>lpp1315</i> - F	TTTAGAAAGCAGCACCCCTTGG	1469007 - 1468987	145pb
			<i>lpp1315</i> - R	AAGGCTAATCACAACGTTTTTGG	1468863 - 1468885	
	<i>lpp1316</i>	c1469589-1469167	<i>lpp1316</i> - F	CGGATGAAGCCCGTAAAGTC	1469489 - 1469470	150pb
			<i>lpp1316</i> - R	TTGGAACAGGATTGCTTGTAGGT	1469340 - 1469362	
	<i>lpp1330</i>	1485268-1486245	<i>lpp1330</i> - F	GGTGAGCATGCTAAGGTGCA	1485454 - 1485473	140pb
			<i>lpp1330</i> - R	TGTTTATCCAAGGCCACAGT	1485593 - 1485573	
	<i>lpp1612a</i>	c1798835-1798221	<i>lpp1612a</i> - F	TTGGTCAAAGTACAGGCAAAGC	1798387 - 1798366	145pb
			<i>lpp1612a</i> - R	AAAGAAGCCACGCCTGCAC	1798243 - 1798261	
	<i>lpp1612b</i>	c1798220-1797582	<i>lpp1612b</i> - F	CGATGATGCTGTGATTCCACA	1797936 - 1797916	145pb
			<i>lpp1612b</i> - R	CAACCCTGGTTTCGCAAGAG	1797792 - 1797811	
	<i>lpp2607</i>	c2971433-2970606	<i>lpp2607</i> - F	TACAACGCGGTAACGAAGGAT	2970994 - 2970974	160pb
			<i>lpp2607</i> - R	GCCATGTCTTTGCCTAACCGT	2970835 - 2970855	

	Gene	Posição do Gene	Nome Primer	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Posição do primer	Amplicação
REPRIMIDOS	<i>lpp0972</i>	1076650-1077247	<i>lpp0972</i> - F	CCTGAGAAAAGACAGGCCACA	1076797 - 1076817	145pb
			<i>lpp0972</i> - R	GTCTGCCAACGTCTCACAA	1076941 - 1076922	
	<i>lpp1170</i>	c1304318-1302012	<i>lpp1170</i> - F	ATTGAAGCGCTGCATACCCT	1303949 - 1303930	155pb
			<i>lpp1170</i> - R	TTATTAGCGCCTGCATGCAC	1303795 - 1303814	
	<i>lpp1177</i>	c1305825-1304470	<i>lpp1177</i> - F	TGCATGATGCTGCTTGTGGT	1305188 - 1305169	145pb
			<i>lpp1177</i> - R	TAGGCCGCATACCCCACTAC	1305044 - 1305063	
	<i>lpp1900</i>	2149421-2152066	<i>lpp1900</i> - F	ACAGATGCTATAGGCGGGTATTG	2150555 - 2150577	160pb
			<i>lpp1900</i> - R	GCCCATGACGGGTATGTTTC	2150714 - 2150695	
	<i>lpp1340</i>	c1496234-1495857	<i>lpp1340</i> - F	ATCCAATGCTGAGGACACAGC	1496172 - 1496152	165pb
			<i>lpp1340</i> - R	GTCACGCATTGTTTCATAAGTCA	1496008 - 1496029	
	<i>lpp2694</i>	c3074007-3073285	<i>lpp2694</i> - F	CTATAGGCAGAGGCGGTGCA	3073520 - 3073501	145pb
			<i>lpp2694</i> - R	TCGTTTAACCACTTGGCATCCT	3073376 - 3073397	

Gene de referência

A transcrição reversa combinada com a análise quantitativa por PCR em tempo real, é uma metodologia adoptada por muitos laboratórios de investigação em todo o mundo, para medir os níveis de transcrição, por ser uma metodologia sensível, precisa, flexível e com baixo custo. No entanto, apesar da sua popularidade, continuam a ver-se erros sistemáticos na sua aplicação, o que compromete a interpretação dos resultados. Uma das fontes comuns de erro é a escolha inadequada de genes de referência para normalizar os níveis de transcrição dos genes em estudo antes da análise comparativa das diferentes amostras biológicas.

Para este projecto o gene de referência seleccionado foi o gene da *gyrase A* (*gyrA*) (DNA gyrase, sub-unidade A, topoisomerase tipo II), conhecido por ser considerado um gene expresso de forma estável na *Lp* Paris [9], o que também foi confirmado pela análise que previamente foi efectuada por *Microarrays*.

O desenho dos *primers* para este gene seguiu as mesmas regras aplicadas ao desenho dos *primers* para os outros genes seleccionados.

Os *primers* escolhidos para a *gyrA* encontram-se referenciados na tabela 6.

Tabela 6 – Gene *gyrA*: posição do gene alvo no genoma da *Lp* Paris (Subject ID - gi|54295983|ref|NC_006368.1), nome do *primer*, respectiva sequência nucleotídica, zona de 100% de homologia e tamanho do fragmento formado (amplificação).

Gene	Posição do Gene	Nome <i>primer</i>	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Posição do <i>primer</i>	Amplificação
<i>gyrA</i>	1527474-1530065	<i>gyrA</i> – F	ATGCTATGCTCCCTGTCCGT	1529368 - 1529387	161pb
		<i>gyrA</i> – R	GACTCCGACGAGGCTGTCAT	1529528 - 1529509	

Este par de *primers* não apresenta homologias superiores a 50% do seu tamanho com outras zonas do genoma da *Lp* Paris, nem apresenta estruturas secundárias com valores negativos de dG segundo a análise efectuada através do programa *Gene Runner* aqui apresentadas de forma resumida.

***Gene Runner* para o *primer* F (Figura 19 – A)**

Não apresenta estruturas secundárias

***Gene Runner* para o *primer* R (Figura 19 – B, C, D)**

Hairpin três estruturas com valores positivos para dG

Dimers seis estruturas com valores positivos para dG

Internal loops duas estruturas com valores positivos para dG

***Gene Runner* para os *primers* F↔R (Figura 19 – E)**

Não apresenta estruturas secundárias

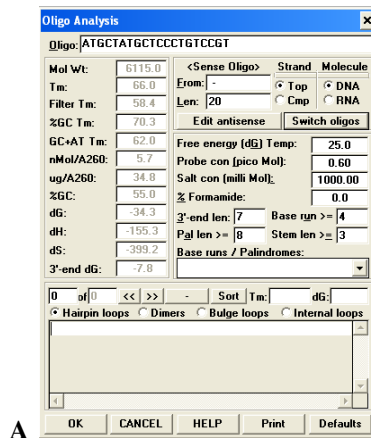


Figura 19 - A - Gene Runner para o primer F da *gyrA*

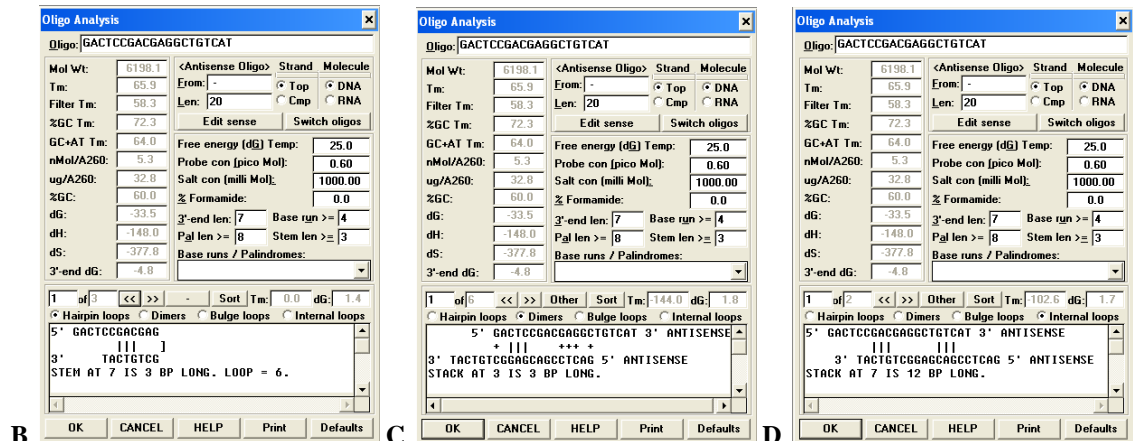


Figura 19 - B, C, D - Gene Runner para o primer R da *gyrA*

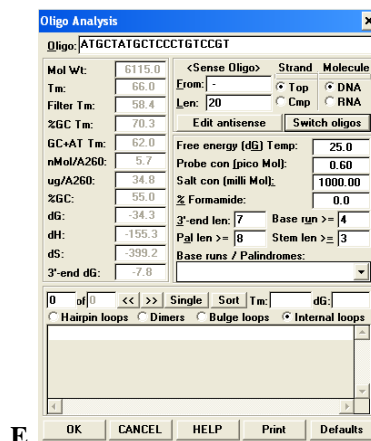


Figura 19 - E - Gene Runner para os primers F↔R da *gyrA*

3.3.3 - PCR em tempo real

Só foram validados os resultados de PCR em tempo real que apresentaram brancos sem amplificação, demonstrando ausência de contaminações nos reagentes utilizados e a formação de dímeros de *primers*. Todas as amostras foram realizadas em duplicado.

3.3.3.1 - Optimização da concentração de *primers*

Os resultados obtidos na optimização dos *primers* foram os indicados na tabela 7.

Avaliando os resultados verificou-se que embora os valores de *Ct* fossem equivalentes a concentração de 0,4µM apresentou, para a maioria dos resultados, coeficientes de variação superiores, apresentando um valor máximo de 4,02%. Assim, a escolha recaiu sobre a concentração de 0,2 µM.

Tabela 7 – Resultados da otimização da concentração de *primers*. Testou-se os *primers* gyrA e lpp1316 nas concentrações 0,2 e 0,4 µM utilizando DNA de *Lp* Paris (LEG) nas concentrações de 5 a 0,000005 ng/µl.

<i>Primers</i>	Amostra	<i>Primer [0,2 µM]</i>			<i>Primer [0,4 µM]</i>		
		<i>Ct</i>	Média	<i>c_v</i> (%)	<i>Ct</i>	Média	<i>c_v</i> (%)
gyrA	LEG 5	17,05	17,14	0,70%	16,72	16,90	1,51%
		17,22			17,08		
	LEG 0,5	19,93	20,12	1,34%	19,93	19,95	0,14%
		20,31			19,97		
	LEG 0,05	23,54	23,78	1,40%	23,44	23,86	2,49%
		24,01			24,28		
	LEG 0,005	27,32	27,25	0,36%	26,12	26,17	0,24%
		27,18			26,21		
	LEG 0,0005	29,68	29,52	0,79%	29,11	29,38	1,28%
		29,35			29,64		
	LEG 0,00005	30,87	31,28	1,83%	30,76	30,65	0,51%
		31,68			30,54		
	LEG 0,000005	32,56	32,82	1,10%	32,26	33,21	4,02%
		33,07			34,15		
lpp1316	LEG 5	17,44	17,67	1,84%	17,01	16,97	0,33%
		17,90			16,93		
	LEG 0,5	20,53	20,52	0,10%	20,10	20,15	0,32%
		20,50			20,19		
	LEG 0,05	24,39	24,26	0,76%	23,88	23,68	1,22%
		24,13			23,47		
	LEG 0,005	26,57	26,83	1,34%	26,10	26,09	0,05%
		27,08			26,08		
	LEG 0,0005	30,43	30,44	0,02%	29,30	29,29	0,05%
		30,44			29,28		
	LEG 0,00005	32,08	31,88	0,91%	31,12	31,62	2,24%
		31,67			32,12		
	LEG 0,000005	33,80	33,38	1,80%	33,26	32,92	1,46%
		32,95			32,58		

3.3.3.2 - Avaliação da especificidade analítica dos *primers*

A especificidade analítica dos *primers*, verificada utilizando os DNAs de *Lp* Paris e de *A. castellanii* com a concentração de 5ng/μl, foi efectuada através da:

- Análise da curva de dissociação (formação de um pico único com a *T_m* esperada)
- Visualização dos fragmentos formados em gel de agarose 1,5%

A título de exemplo são apresentados os gráficos das curvas de dissociação obtidas para o par de *primers* da *gyrA*, *lpp0972*, *lpp1316*, *lpp1612b* e *lpp2694* (figuras 20, 21 e 22).

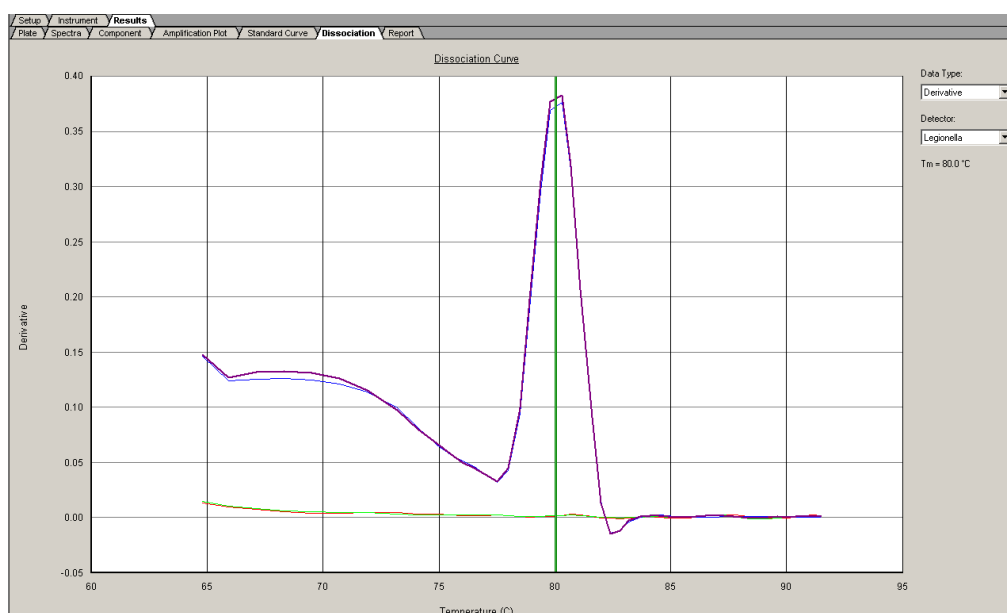


Figura 20- Curva de dissociação e *T_m* para o par de *primers* *gyrA*

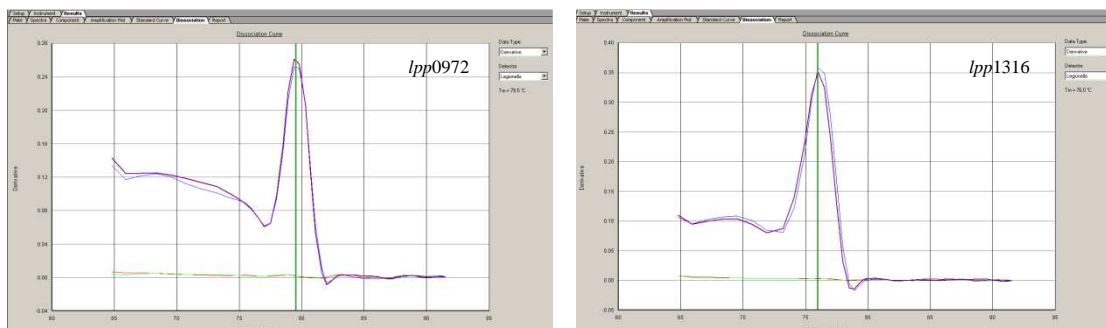


Figura 21- Curvas de dissociação e *T_m* para o par de *primers* *lpp0972* e *lpp1316*

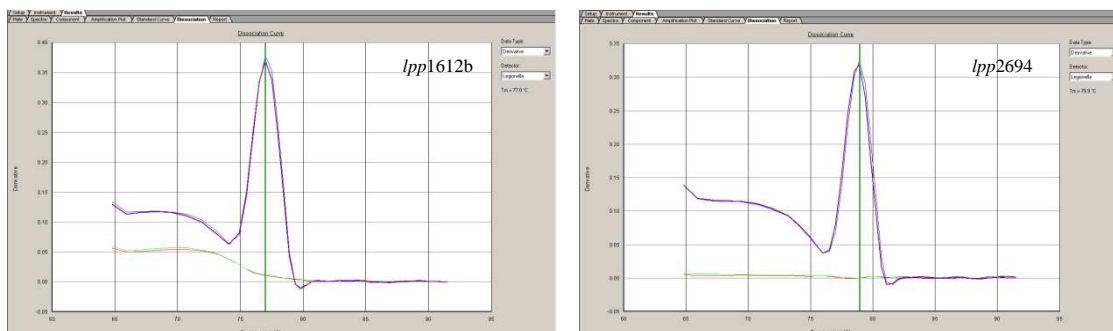


Figura 22- Curvas de dissociação e T_m para o par de *primers* lpp1612b e lpp2694

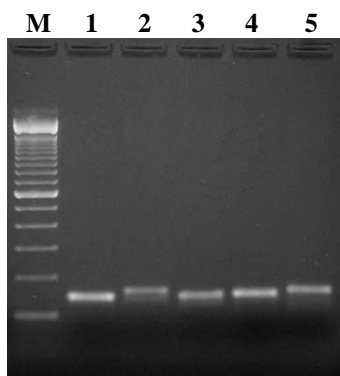
Todos os pares de *primers* apresentaram, nas curvas de dissociação, um pico único e ausência de dímeros. Na tabela 8 é apresentada a T_m de todos os pares de *primers* seleccionados.

Tabela 8 – T_m para cada par de *primers* determinada por PCR em tempo real

	<i>Primers</i>	T_m (°C)		<i>Primers</i>	T_m (°C)
	gyrA	80,0			
Genes Induzidos	lpp0094	78,5	Genes Reprimidos	lpp0972	79,5
	lpp0845	74,1		lpp1170	79,0
	lpp1315	75,0		lpp1177	81,3
	lpp1316	76,0		lpp1340	75,7
	lpp1330	76,2		lpp1900	76,0
	lpp1612a	78,5		lpp2694	78,9
	lpp1612b	77,0			
	lpp2607	78,1			

Como previsto, dadas as restrições impostas na fase de desenho dos *primers* e uma vez que o tamanho do amplicão é muito semelhante, as T_m para os diferentes pares de *primers* apresentam valores próximos, variando entre 74,1°C e 81,3°C.

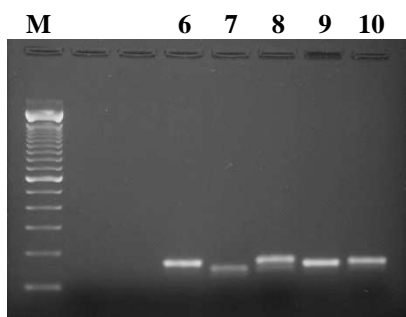
Após a análise das curvas de dissociação e confirmação das respectivas T_m , os fragmentos formados foram visualizados em gel de agarose 1,5%.



Legenda:

M	Marcador de peso molecular (100pb)	
	Primers	Tamanho do fragmento
1	lpp1330	140pb
2	lpp0094	158pb
3	lpp1315	145pb
4	lpp1177	145pb
5	lpp1170	155pb

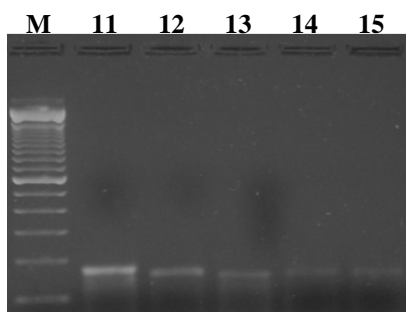
Figura 23 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por PCR tempo real dos *primers*: lpp1330, lpp0094, lpp1315, lpp1177 e lpp1170.



Legenda:

M	Marcador de peso molecular (100pb)	
	Primers	Tamanho do fragmento
6	lpp2607	160pb
7	lpp1612a	145pb
8	lpp0845	165pb
9	lpp1900	160pb
10	lpp1340	165pb

Figura 24 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por PCR tempo real dos *primers*: lpp2607, lpp1612a, lpp0845, lpp1900 e lpp1340.



Legenda:

M	Marcador de peso molecular (100pb)	
	Primers	Tamanho do fragmento
11	gyrA	161pb
12	lpp1316	150pb
13	lpp1612b	145pb
14	lpp0972	145pb
15	lpp2694	145pb

Figura 25 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% após amplificação por PCR tempo real dos *primers*: gyrA, lpp1316, lpp1612b, lpp0972 e lpp2694.

Estes resultados vêm confirmar as curvas de dissociação, isto é, a existência de um fragmento único, cujo tamanho é o esperado.

Através da avaliação da especificidade analítica dos *primers* confirmou-se que os *primers* desenhados amplificam unicamente DNA de *Lp* Paris. Este ponto é essencial para validar os resultados da PCR com os cDNAs obtidos dos sedimentos recolhidos após as 25h de infecção. Estes sedimentos contêm legionelas que se multiplicaram dentro das amibas bem como destroços celulares provenientes da lise e algumas amibas que não foram infectadas. Assim, ao extrair RNA destas amostras não podemos garantir que este seja unicamente de legionela.

Todos os pares de *primers* seleccionados foram submetidos a esta avaliação obtendo-se os resultados apresentados na tabela 9.

Por forma a avaliar os resultados duvidosos, que se encontram realçados na tabela 9 (*primers*: lpp1177, lpp1612a, lpp2607 e lpp2694), isto é, cujos valores de *Ct* indicavam uma possível ligação ao genoma de *A. castellanii*, foi efectuada a análise das curvas amplificação e de dissociação (**figuras 26 à 29**).

Tabela 9 – Resultados da especificidade analítica dos pares de *primers* desenhados neste estudo, LEG representa o DNA *Lp* Paris [5ng/μl] e AC o DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

<i>Primers</i>	<i>Amostra</i>	<i>Ct</i>	<i>Primers</i>	<i>Amostra</i>	<i>Ct</i>
gyrA	LEG	17,05	lpp1315	LEG	15,27
	LEG	17,22		LEG	15,24
	AC	Sem amplificação		AC	39,82
	AC	Sem amplificação		AC	Sem amplificação
lpp0094	LEG	16,55	lpp1316	LEG	17,44
	LEG	17,02		LEG	17,90
	AC	Sem amplificação		AC	Sem amplificação
	AC	39,84		AC	Sem amplificação
lpp0845	LEG	15,28	lpp1330	LEG	15,09
	LEG	15,25		LEG	15,13
	AC	Sem amplificação		AC	39,71
	AC	Sem amplificação		AC	Sem amplificação
lpp0972	LEG	18,30	lpp1340	LEG	15,26
	LEG	18,44		LEG	15,09
	AC	39,61		AC	39,17
	AC	Sem amplificação		AC	39,77
lpp1170	LEG	15,02	lpp1612a	LEG	18,7
	LEG	14,86		LEG	18,85
	AC	39,02		AC	29,59
	AC	38,5		AC	29,98
lpp1177	LEG	15,09	lpp1612b	LEG	17,96
	LEG	15,03		LEG	18,20
	AC	29,41		AC	Sem amplificação
	AC	36,41		AC	Sem amplificação
lpp1900	LEG	15,03	lpp2607	LEG	15,1
	LEG	15,01		LEG	15,2
	AC	Sem amplificação		AC	Sem amplificação
	AC	Sem amplificação		AC	18,96
			lpp2694	LEG	17,37
				LEG	17,58
				AC	32,00
				AC	32,47

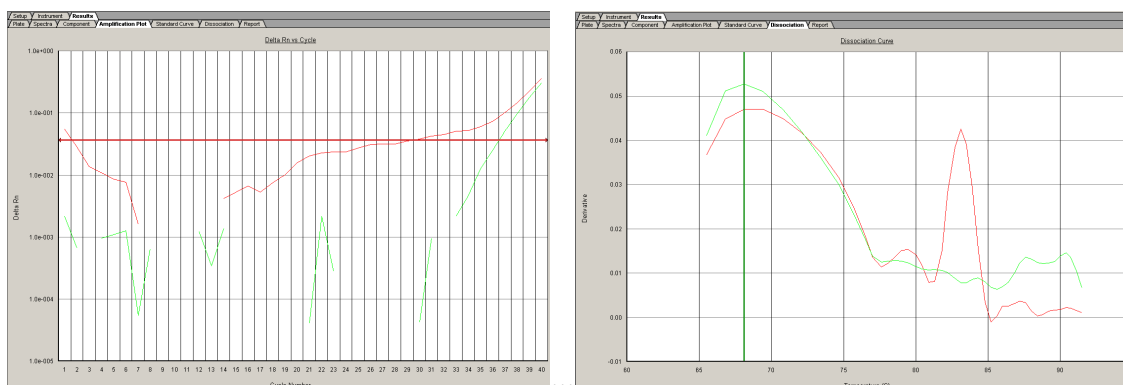


Figura 26 – Curva de amplificação e dissociação referente ao para de *primers* lpp1177 com a amostra de DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

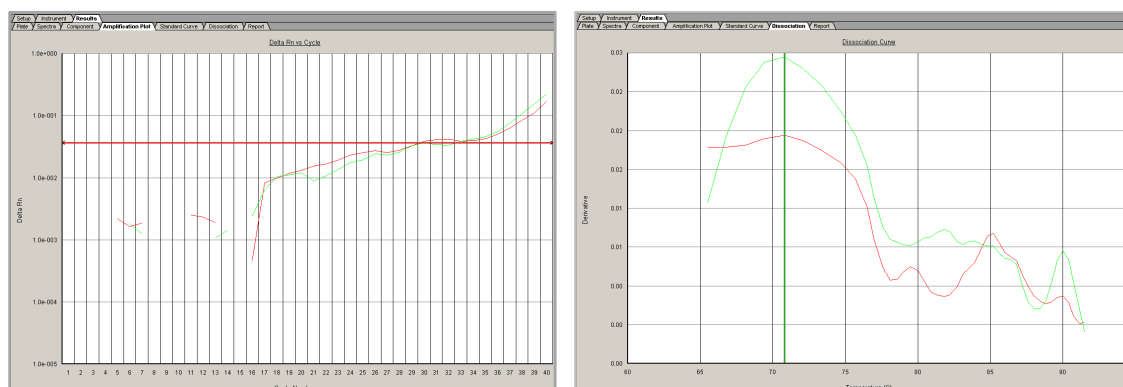


Figura 27 – Curva de amplificação e dissociação referente ao para de *primers* lpp1612a com a amostra de DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

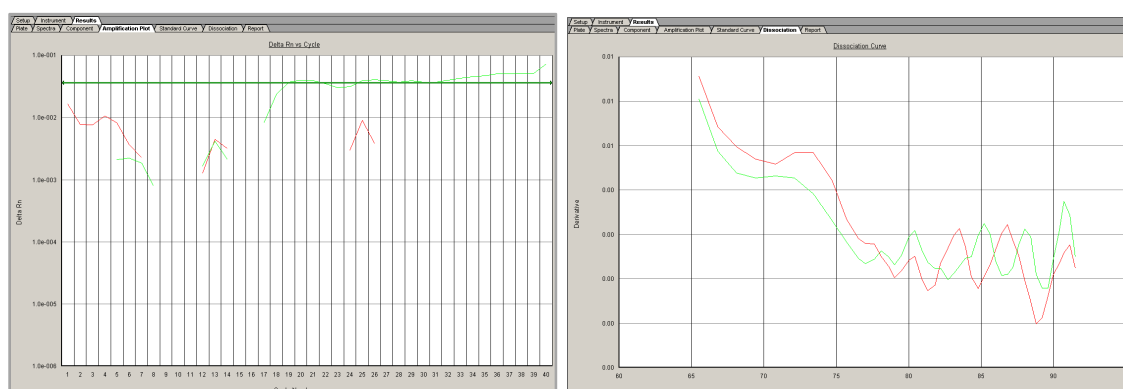


Figura 28 – Curva de amplificação e dissociação referente ao para de *primers* lpp2607 com a amostra de DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

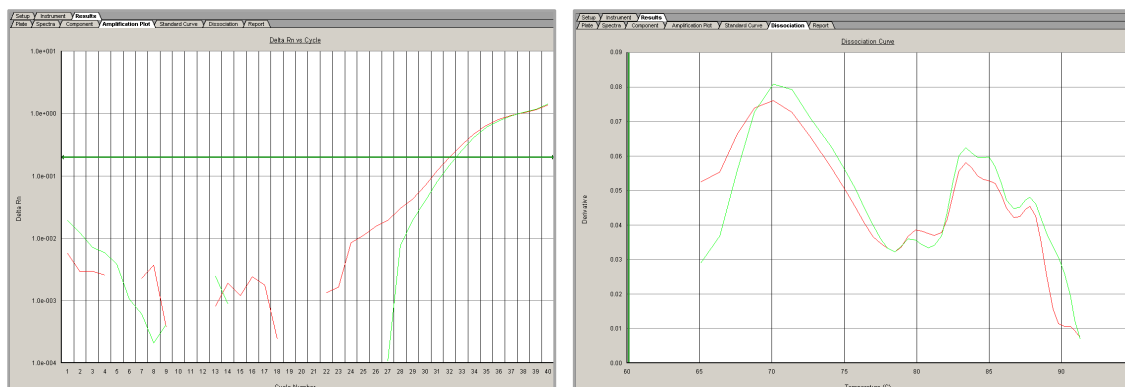


Figura 29 – Curva de amplificação e dissociação referente ao par de *primers* lpp2694 com a amostra de DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

Pela análise das respectivas curvas é possível verificar que não há ligação específica ao genoma de *A. castellanii*, não sendo necessário eliminar estes genes do estudo da expressão génica. Quando analisadas simultaneamente as curvas de dissociação para *Lp* Paris e *A. castellanii* verificou-se que apenas hesiste um pico com a T_m esperada. A título de exemplo é apresentada a curva de dissociação para o par de *primers* lpp2694.

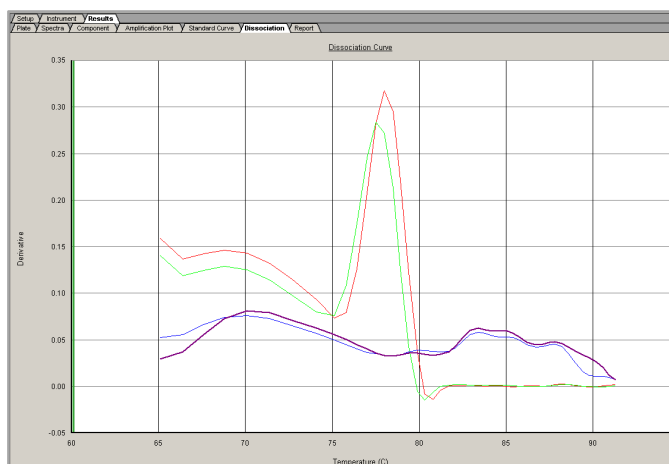
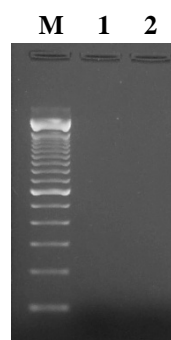


Figura 30 – Curva de dissociação referente ao par *primers* lpp2694 e as amostras de DNA *Lp* Paris [5ng/μl] e DNA de *A. castellanii* [5ng/μl].

Para confirmar esta decisão foi igualmente efectuada uma electroforese em gel de agarose a 1,5% tendo sido verificado a ausência de fragmentos de amplificação. Na figura 31 é apresentado o resultado do gel para análise dos produtos de amplificação referente aos pares de *primers* lpp2607 e lpp1612a, como exemplo.



Legenda:

M -	Marcador de peso molecular (100pb)	
	Amostra	Ct
1 -	lpp2607 + AC	18,96
2 -	lpp1612a + AC	29,59

Figura 31 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação para os pares de *primers* lpp2607 e lpp1612a com o DNA de *A. castellanii*.

Os *primers* que apresentaram *Cts* duvidosos foram ainda submetidos a um novo ensaio de PCR em tempo real. Neste ensaio obtiveram-se novamente valores de *Ct* duvidosos para o par lpp2694, com os seguintes resultados:

Tabela 10 – Resultados do segundo ensaio referente ao estudo da especificidade do par de *primers* lpp2694 com o DNA de *A. castellanii* 5 ng/μl

<i>Primers</i>	Amostra	<i>Ct</i>
lpp2694	AC	31,08
	AC	31,19

Por esta razão, não será possível garantir que os valores de *Ct* obtidos com os cDNAs dos sedimentos de *Lp* Paris recolhidos após a co-cultura em *A. castellanii* (25h de infecção) são referentes apenas à ligação com o genoma de *Legionella*. Assim, este gene foi rejeitado para o estudo da expressão génica.

3.3.3.3 - Avaliação da sensibilidade dos *primers*

Os ensaios para avaliação da sensibilidade foram realizados utilizando diluições seriadas de DNA de *Lp* Paris desde a concentração de 5 até 0,000005 ng/μl (equivalente a uma unidade de genoma (UG)). Todos os *primers* seleccionados foram submetidos a esta avaliação obtendo-se os resultados apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados do estudo da sensibilidade dos *primers*.

	<i>Primers</i>	Limite de sensibilidade
	gyrA	1 UG
Genes Induzidos	lpp0094	10 UG
	lpp0845	1 UG
	lpp1315	1 UG
	lpp1316	1 UG
	lpp1330	1 a 10 UG
	lpp1612a	Superior a 100 UG
	lpp1612b	1 UG
	lpp2607	1 UG
	lpp0972	1 UG
Genes Reprimidos	lpp1170	1UG
	lpp1177	1 a 10 UG
	lpp1340	1 UG
	lpp1900	1 a 10 UG

Com excepção do par de *primers* lpp1612a, os restantes apresentaram boa sensibilidade, na maioria com um limite equivalente 1UG (0,000005 ng/μl).

Por apresentar baixa sensibilidade os *primers* lpp1612a foram eliminados e por isso não foram utilizados no estudo da expressão génica.

3.3.3.4 - Optimização do volume de amostra

Para esta avaliação foram testados os volumes de 2 e 4 μl de cDNA de *Lp* Paris obtendo-se os resultados apresentados na tabela 12.

Pela análise dos resultados, verificou-se que os valores obtidos (*Ct* e respectivo Desvio Padrão) eram, para a maioria das amostras, mais baixos quando se utilizou o volume de 2μl. Sendo o critério de escolha o menor valor de *Ct*, o volume seleccionado para a amostra recaiu nos 2μl [31].

Tabela 12 – Resultados do estudo de otimização do volume de amostra, utilizando cDNA de *Lp* Paris obtido de uma cultura na fase exponencial (amostra 7), fase estacionária (amostra 9) e após infecção (amostra 15).

	Volume de amostra (2µl)		Volume de amostra (4µl)	
Amostra	Ct	Desvio padrão	Ct	Desvio padrão
gyrA + amostra 7	24,41	0,177	25,05	3,585
gyrA + amostra 7	24,66		30,12	
gyrA + amostra 9	22,74	0,184	23,12	0,255
gyrA + amostra 9	22,48		22,76	
gyrA + amostra 15	30,80	0,113	30,67	1,817
gyrA + amostra 15	30,64		33,24	
1900 + amostra 7	27,61	0,049	32,19	-
1900 + amostra 7	27,54		Sem amplificação	
1900 + amostra 9	21,24	9,136	27,33	1,117
1900 + amostra 9	34,16		25,75	
1330 + amostra 9	23,81	0,021	26,57	0,127
1330 + amostra 9	23,84		26,39	
1330 + amostra 15	29,22	0,021	36,78	1,294
1330 + amostra 15	29,25		38,61	

3.3.3.5 - Avaliação da reprodutibilidade intra e inter-ensaio

Para a avaliação da **reprodutibilidade intra-ensaio**, foram realizados triplicados com amostras de DNA e cDNA de *Lp* Paris, e utilizados os *primers* gyrA, lpp0972, lpp1330, lpp1316, lpp1612b e lpp1900 tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 13.

No que respeita à avaliação da **reprodutibilidade inter-ensaio**, os resultados dos três ensaios realizados com diferentes concentrações de cDNA e em triplicado são apresentados na tabela 14 e os respectivos coeficientes de variação na tabela 15

Tabela 13 – Resultados do estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Amostra 1 (cDNA de *Lp* Paris – fase estacionaria tardia), Amostra 2 (DNA de *Lp* Paris [5ng/μl]).

<i>Primers</i>	<i>Amostra</i>	<i>Ct</i>	<i>c_v</i> (%)	<i>Primers</i>	<i>Amostra</i>	<i>Ct</i>	<i>c_v</i> (%)
lpp1330	(1)	27,93	3,31%	lpp0972	(2)	18,25	0,40%
		26,69				18,13	
		26,24				18,12	
lpp1900	(1)	27,12	5,21%	lpp1316	(2)	17,95	0,77%
		24,89				17,77	
		24,74				17,68	
gyrA	(2)	17,01	0,26%	lpp1612b	(2)	18,11	1,40%
		17,02				17,83	
		17,09				17,61	

Tabela 14 – Resultados do estudo da reprodutibilidade inter-ensaio. Utilizou-se uma *pool* de cDNA (MIX), testou-se sem diluição e diluída a 1/50; 1/100 e 1/1000 e os *primers* gyrA e lpp1316

	Primeiro ensaio (Ct)	Segundo ensaio (Ct)	Terceiro ensaio (Ct)
gyrA + MIX	22,66	21,55	21,74
	22,61	21,56	21,98
	22,63	21,51	23,79
gyrA + MIX 1/50	28,34	27,39	27,46
	28,32	27,10	27,33
	28,83	27,09	24,69
gyrA + MIX 1/100	29,56	28,15	29,42
	29,70	28,31	29,64
	29,61	28,42	29,54
gyrA + MIX 1/1000	33,13	33,56	34,11
	32,98	36,53	33,16
	32,10	32,50	32,21
1316 + MIX	23,13	23,61	23,19
	23,06	24,75	23,77
	23,04	23,36	23,68
1316 +MIX 1/50	28,34	26,79	28,36
	28,38	26,82	28,36
	28,44	27,44	28,55
1316 + MIX 1/100	29,78	30,70	31,04
	29,56	30,65	30,75
	29,40	30,66	30,97
1316 + MIX 1/1000	32,86	33,50	34,06
	33,24	35,44	34,12
	33,74	33,99	34,58

Tabela 15 – Resultados do coeficiente de variação (em percentagem) referentes ao estudo da reprodutibilidade inter-ensaio.

Amostra	c_v %
gyrA + MIX	3,43%
gyrA + MIX 1/50	4,34%
gyrA + MIX 1/100	2,23%
gyrA + MIX 1/1000	4,04%
1316 + MIX	2,30%
1316 + MIX 1/50	2,58%
1316 + MIX 1/100	2,07%
1316 + MIX 1/1000	2,23%

Pelos resultados apresentados verifica-se que a variabilidade entre os triplicados no mesmo ensaio e entre ensaios diferentes varia entre os 0,26% e os 5,21% o que mostra uma boa reprodutibilidade, no entanto tal como esperado os valores de *Ct* são menos reprodutíveis quando trabalhamos com números de cópias muito baixos [11].

3.3.3.6 - Estudo da linearidade e eficiência

A **avaliação da linearidade** foi realizada utilizando diluições seriadas de DNA *Lp* Paris. A Tabela 16 e a figura 32 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 16 – Valores obtidos no ensaio para o cálculo da linearidade. Utilizou-se os *primers* lpp0972 e lpp1612b e DNA de *Lp* Paris nas concentrações de 5 a 0,000005 ng/μl

DNA (ng)	Log DNA (ng)	C_t (Média dos duplicados)	
		lpp0972	lpp1612b
5	0,69897	18,37	18,08
0,5	-0,30103	21,46	21,17
0,05	-1,30103	24,41	24,32
0,005	-2,30103	27,90	27,61
0,0005	-3,30103	31,92	31,87
0,00005	-4,30103	34,88	34,42
0,000005	-5,30103	37,15	37,67

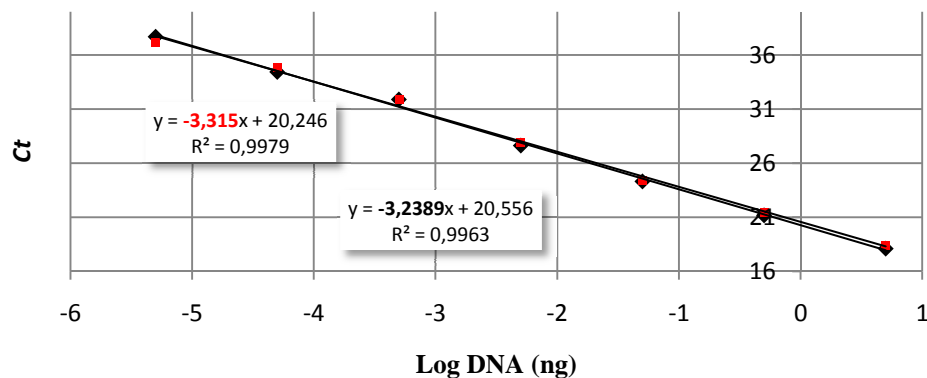


Figura 32 – Gráfico do estudo da linearidade.

Considerando que a linearidade é a conservação constante da eficiência com o aumento da concentração de amostra (RNA ou DNA), a partir da fórmula da eficiência pode-se extrapolar que um ensaio com uma eficiência de 100%, vai duplicar uma vez em cada ciclo, ou 10 vezes a cada 3,32 ciclos. Assim, curvas padrão que têm declives inferiores a -3,3 indicam uma perda de eficiência com o aumento da concentração de amostra. [6, 3, 22]

Com os resultados obtidos verificaram-se $R^2 = 0,9979$ e $0,9963$ respectivamente, para os *primers* lpp0972 e lpp1612b, indicando que existe uma boa linearidade e que a expressão destes genes poderá ser analisada no mesmo ensaio de PCR.

Para a **determinação da eficiência (E)** é apresentado a título de exemplo os resultados da determinação da eficiência para os *primers* lpp0972, lpp1330, lpp1612b, lpp1900 e para o gene de referência (*gyrA*).

A determinação da E permitiu avaliar se o gene de referência é adequado à quantificação relativa utilizando o algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [45].

Tabela 17 – Valores obtidos no ensaio para o cálculo da eficiência. *Primers gyrA, lpp0972, lpp1330, lpp1612b, lpp1900 e DNA de Lp Paris nas concentrações de 5 a 0,0005ng/μl*

DNA (ng)	Log DNA (ng)	Ct (Média dos duplicados)				
		gyrA	lpp0972	lpp1330	lpp1612b	lpp1900
5	0,69897	17,14	18,37	17,34	18,08	17,13
0,5	-0,30103	20,12	21,46	20,18	21,17	20,22
0,05	-1,30103	23,78	24,41	23,56	24,32	23,51
0,005	-2,30103	27,25	27,90	27,62	27,61	27,17
0,0005	-3,30103	29,52	31,92	30,56	31,87	30,08

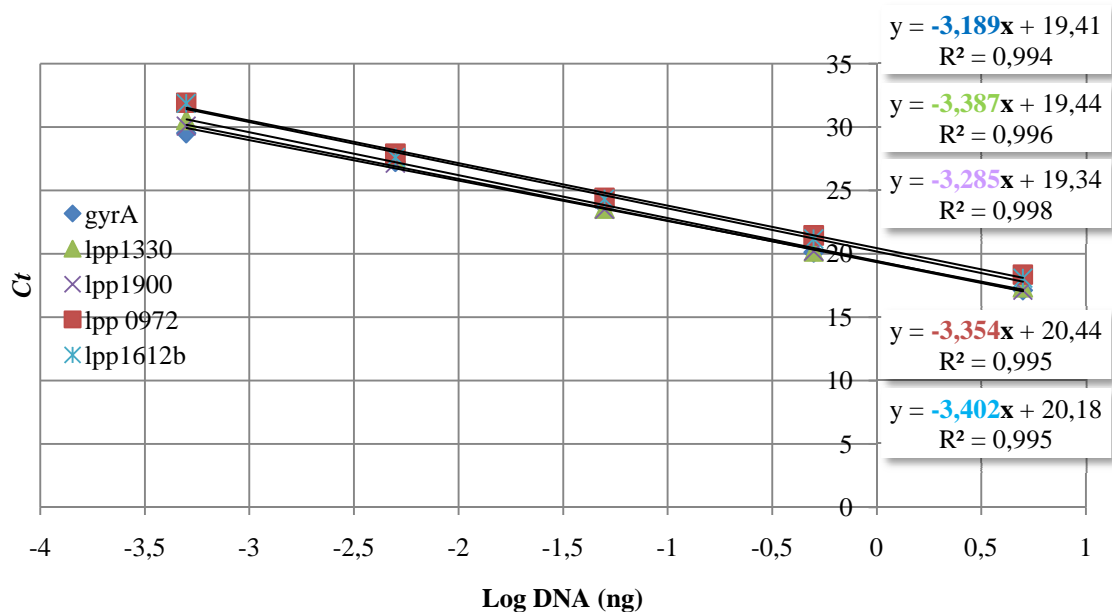


Figura 33 – Gráfico de dispersão simultâneo para os *primers gyrA, lpp0972, lpp1330, lpp1612b, lpp1900*, respectiva linha de tendência, equações da recta e R².

O cálculo da eficiência foi realizado segundo a equação $E = (10^{(-1/s)} - 1) \times 100$ onde *S* é o declive da recta [66, 6, 3, 22].

Neste ensaio foram apuradas eficiências de **105,86%** para *gyrA*, **98,68%** para *lpp0972*, **97,35%** para *lpp1330*, **96,76%** para o *lpp1612b* e **101,56%** para *lpp1900*. Observou-se que entre $E_{gene\ alvo}$ e E_{gyrA} não havia variação superior a 10%, logo, o algoritmo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ podia ser aplicado.

O facto de terem sido apuradas eficiências superiores a 100% poderá dever-se a possíveis erros de pipetagem, nas diluições ou no PCR, que tiveram como consequência directa pequenas variações de C_t .

Outro método para avaliar se dois *primers* apresentam a mesma eficiência é recorrendo ao cálculo dos valores de ΔC_t (C_t alvo – C_t referência) que, quando colocados *versus* Log DNA permitem criar uma recta de regressão onde o valor do declive é usado como um critério geral para a validação experimental do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (idealmente o valor absoluto do declive <0,1) [66, 47]. Como exemplo é apresentado o gráfico de validação experimental entre a *gyrA* e o *lpp1900*.

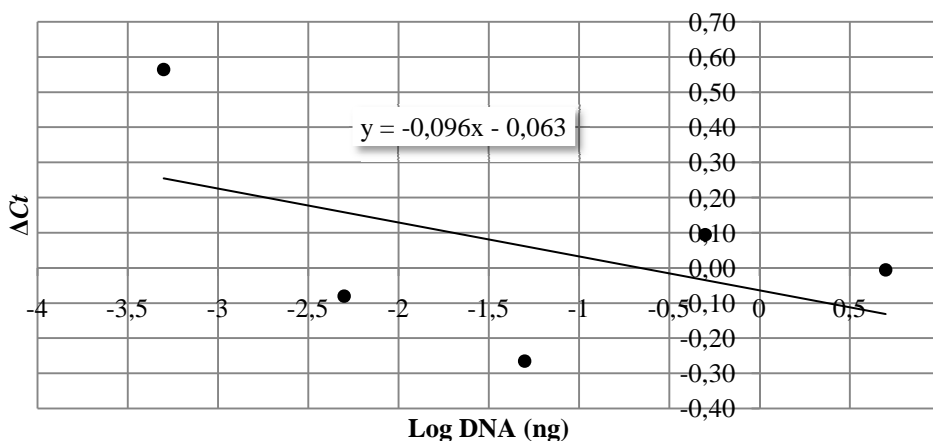


Figura 34 – Gráfico de validação experimental (ΔC_t vs Log DNA) para os *primers* *gyrA* e *lpp1900*.

Com os resultados obtidos através do gráfico de validação experimental, verificou-se que o valor do declive é -0,096 (inferior a 0,1) logo, as eficiências de amplificação entre o gene alvo (*lpp1900*) e o gene de referência (*gyrA*) são equivalentes confirmando a viabilidade da aplicação do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação relativa.

3.3.3.7- Cálculo da expressão génica e análise de resultados

No estudo da expressão génica utilizou-se o protocolo de PCR em tempo real cuja mistura de reacção tem a seguinte composição:

- 10 µl *SYBER Green PCR Master Mix*
- 2 µl *primer F* (0,2 µM)
- 2 µl *primer R* (0,2 µM)
- 2 µl amostra
- 4 µl água ultra pura livre de DNases e RNases

O cálculo da expressão génica foi efectuado entre a expressão de cada gene alvo na amostra em análise (*Lp* Paris após 25 horas de infecção em *A.castellanii*) e a sua expressão na amostra calibradora (*Lp* Paris na fase estacionária - precoce ou tardia) com recurso ao modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (considerou-se a eficiência de 100%). Na normalização dos dados utilizou-se, como referido anteriormente, o gene *gyrA* porque os seus níveis de expressão são constantes, isto é, não são afectados pelas variáveis em estudo (passagem pela *A. castellanii*).

Os **resultados da expressão génica relativa** aqui apresentados são a média de duas réplicas biológicas. Em anexo (ver anexo 10) apresenta-se uma tabela exemplificativa dos cálculos efectuados.

Foram considerados resultados sem alteração, todos aqueles que apresentaram valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dentro do intervalo [-2;2].

A Tabela 18 e a figura 35 apresentam os resultados obtidos para a fase estacionária precoce.

Tabela 18 – Valores da expressão génica relativa da *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* utilizando como inoculo a fase estacionária **precoce**.

Genes	Descrição	Fase estacionária precoce (2 ^{-ΔΔCt})		
		Primeiro Ensaio ¹	Segundo Ensaio ¹	Média
<i>lpp0094</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-2,33	2,62	0,15
<i>lpp0845</i> (<i>csrA</i>)	Regulador global de CsrA	3,08	1,53	2,31
<i>lpp0972</i>	Similar à proteína EnhA	-32,47	-9,13	-20,80
<i>lpp1170</i>	Proteína regulatória (Domínios GGDEF e EAL)	1,28	-1,52	-0,12
<i>Lpp1177</i>	Hipotética proteína – Sem função conhecida	1,35	-1,25	0,05
<i>lpp1315</i> (<i>lspH</i>)	Proteína LspH (Via secretória do tipo II)	-1,82	3,94	1,06
<i>lpp1316</i> (<i>lspG</i>)	Proteína LspG (Via secretória do tipo II)	6,43	4,10	5,26
<i>lpp1330</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	6,50	6,49	6,50
<i>lpp1340</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-14,36	-10,5	-12,43
<i>lpp1612b</i> (<i>sidB</i>)	Parte C-terminal da proteína SidB	18,70	2,68	10,69
<i>lpp1900</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-6,41	-6,59	-6,50
<i>lpp2607</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	3,71	2,97	3,34

¹ Os resultados positivos indicam indução do gene e os resultados negativos repressão do gene.

Os resultados referentes aos ensaios com culturas líquidas de *Lp* Paris em fase estacionária precoce (figura 35) mostraram que, dos 12 genes estudados, oito alteraram a sua expressão relativa após co-cultura em *A. castellanii*, cinco dos quais foram induzidos. Os mais expressos foram *lpp1612b* (*sidB*), *lpp1330* e *lpp1316* (*lspG*), respectivamente. Sabemos que a proteína SidB pertence ao sistema *Dot/Icm* [9] e é necessária para a formação do vacúolo replicativo no hospedeiro e que a proteína LspG pertence ao sistema secretório do tipo II [60], já o gene *lpp1330* codifica para uma hipotética proteína sem função conhecida até à data da realização deste projecto [60]. O gene *lpp0972* foi de todos os genes estudados o que apresentou maior repressão.

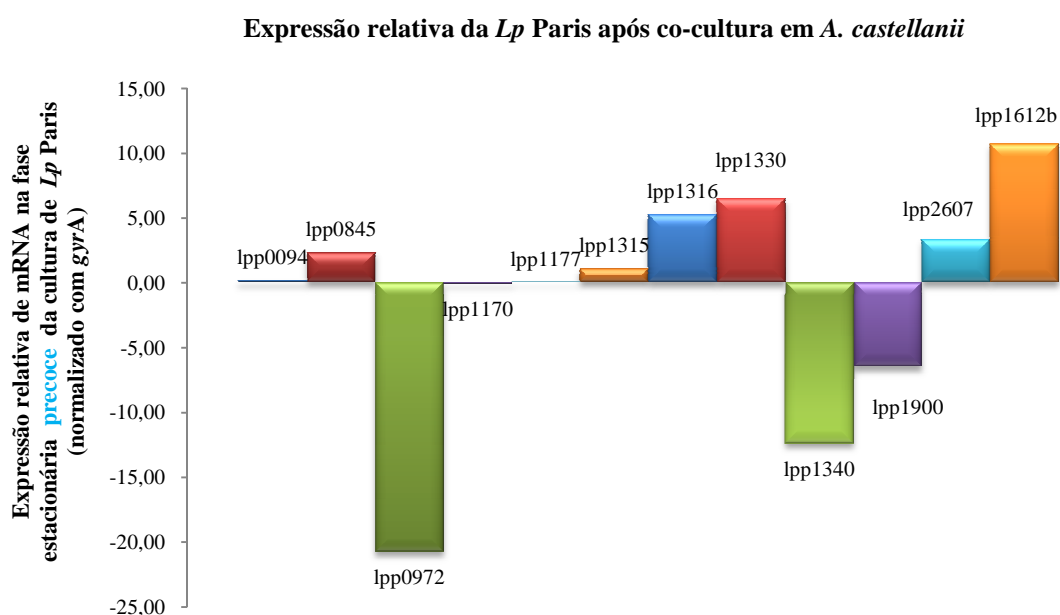


Figura 35 – Expressão relativa de mRNA de *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* (o inoculo para a infecção da *A. castellanii* foi recolhido na fase estacionária **precoce**)

Correlacionando os resultados obtidos com os resultados dos *Microarrays* (ver anexo 9), verificou-se que oito dos 12 genes estudados confirmaram os resultados anteriores: *lpp0845* (*crsA*), *lpp1316* (*lspG*), *lpp1612b* (*sidB*), *lpp0972*, *lpp1330*, *lpp1340*, *lpp1900*, *lpp2607*.

Na tabela 19 e figura 36 são apresentados os **resultados da expressão génica relativa** dos genes alvo para a fase estacionária **tardia**.

Tabela 19 – Valores da expressão gênica relativa da *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* utilizando como inoculo a fase estacionária **tardia**.

Genes	Descrição	Fase estacionária tardia ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		Primeiro Ensaio ¹	Segundo Ensaio ¹	Média
<i>lpp0094</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-10,74	-2,41	-6,58
<i>lpp0845</i> (<i>csrA</i>)	Regulador global de CsrA	-5,08	-3,98	-4,53
<i>lpp0972</i>	Similar à proteína EnhA	-312,50	-909,09	-610,80
<i>lpp1170</i>	Proteína regulatória (Domínios GGDEF e EAL)	-19,29	-1,00	-10,15
<i>lpp1177</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-6,00	-1,08	-3,54
<i>lpp1315</i> (<i>lspH</i>)	Proteína LspH (Via secretória do tipo II)	-4,47	-1,05	-2,76
<i>lpp1316</i> (<i>lspG</i>)	Proteína LspG (Via secretória do tipo II)	1,45	1,72	1,59
<i>lpp1330</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-19,49	-3,85	-11,67
<i>lpp1340</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-28,94	-30,0	-29,47
<i>lpp1612b</i> (<i>sidB</i>)	Parte C-terminal da proteína SidB	-5,39	-25,10	-15,25
<i>lpp1900</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-163,93	-2,51	-83,22
<i>lpp2607</i>	Hipotética proteína - Sem função conhecida	-86,52	1,78	-42,37

¹ Os resultados positivos indicam indução do gene e os resultados negativos repressão do gene.

Nos ensaios com culturas líquidas de *Lp* Paris em fase estacionária **tardia** (figura 36), verificou-se que todos os genes estudados, com exceção do *lpp1316* (*lspG*), apresentaram repressão após co-cultura em *A. castellanii*.

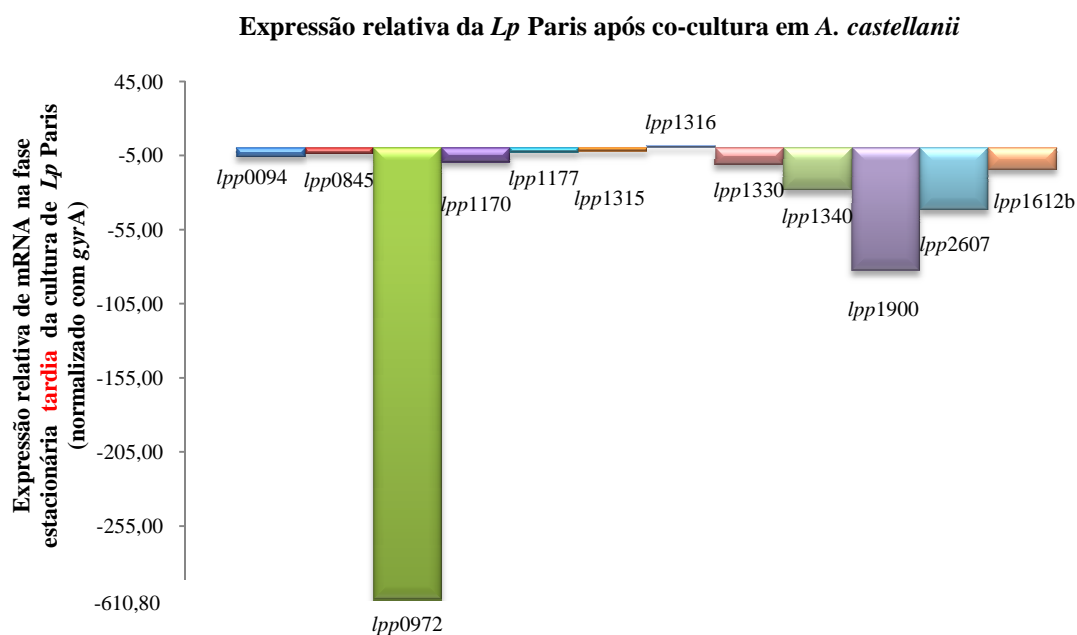


Figura 36 – Expressão relativa de mRNA de *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii*. O inoculo para a infecção da *A. castellanii* foi recolhido na fase estacionária **tardia**. (O gráfico de barras referente ao gene *lpp0972* não se encontra à escala)

Apenas cinco genes confirmaram os resultados obtidos anteriormente por *Microarrays* (ver anexo 9): *lpp0972*, *lpp1170*, *lpp1177*, *lpp1340* e o *lpp1900*.

Sabemos que os genes *lpp1900*, *lpp1177* e *lpp1340* codificam para hipotéticas proteínas sem função conhecida [16], o *lpp0972* (gene que codifica para uma proteína similar à EnhA melhora a absorção da *L. pneumophila* em células hospedeiras e *lpp1170* (proteína pertencente aos domínios GGDEF (*diguanylate cyclase*) e EAL (*diguanylate phosphodiesterase*) são reguladores das respostas enzimáticas [60, 9]. O *lpp0972* (EnhA) foi de todos os genes estudados o que apresentou maior repressão.

Analisando os resultados da expressão génica relativa obtidos para a fase estacionária precoce e tardia, verificou-se que o perfil de expressão de *Lp* Paris foi modificado pela interacção com *A. Castellanii*. No entanto, essa mudança foi dependente da fase do seu ciclo de vida. Os resultados da expressão génica para a fase estacionária precoce apresentaram maior correlação com os estudos anteriormente obtidos por *Microarrays*.

No decurso deste trabalho foi também analisado o comportamento dos genes em estudo durante a cultura líquida (os resultados apresentados são de um ensaio). Assim, comparou-se a expressão génica entre a fase exponencial (amostra calibradora - *Lp* Paris após 12 horas de cultura líquida) e a amostra teste (*Lp* Paris na fase estacionária). Em anexo (ver anexo 11) encontra-se a folha de cálculo utilizada.

Com este ensaio pretendeu-se ver a evolução dos genes em estudo ao longo crescimento em cultura líquida, isto é, comparar a fase virulenta (estacionária) com a fase replicativa (exponencial) e perceber quais os genes que estão modificados quando a *Lp* Paris está na fase virulenta (fase estacionária).

Na tabela 20 e figura 37 são apresentados os resultados da expressão relativa de mRNA de *Lp* Paris na fase **estacionária** da cultura líquida.

Tabela 20 – Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resultantes do cálculo da expressão génica relativa de *Lp* Paris na fase **estacionária** da cultura líquida, onde os resultados positivos indicam indução do gene e os resultados negativos repressão do gene.

Genes	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>lpp0094</i>	5,46
<i>lpp0845</i>	2,13
<i>lpp0972</i>	299,21
<i>lpp1170</i>	7,70
<i>lpp1177</i>	18,64
<i>lpp1315</i>	113,38
<i>lpp1316</i>	1,72
<i>lpp1330</i>	7,92
<i>lpp1340</i>	10550,32
<i>lpp1612b</i>	4,18
<i>lpp1900</i>	92,73
<i>lpp2607</i>	10,13

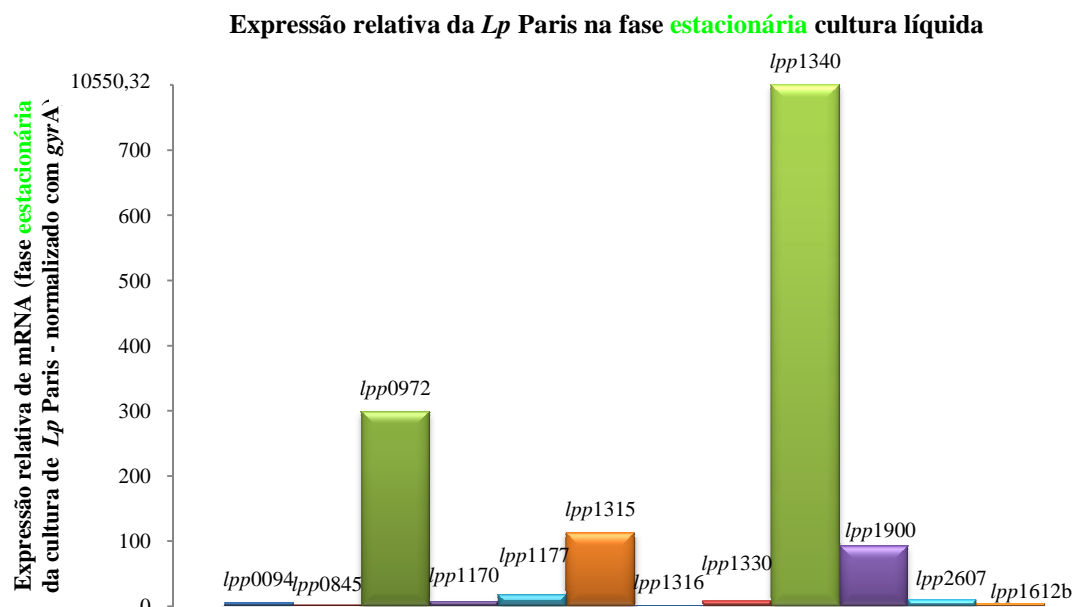


Figura 37 – Gráfico representativo da expressão relativa de mRNA de *Lp* Paris na fase *estacionária* da cultura líquida (O gráfico de barras referente ao gene *lpp1340* não se encontra à escala).

Os resultados mostram que apenas um dos 12 genes em estudo (*lpp1316*) não apresenta indução na fase *estacionária* da cultura líquida de *Lp* Paris. Estes valores deverão ser confirmados com nova réplica biológica e a confirmarem-se parecem sugerir que estes genes são importantes para a fase virulenta. Os genes com maior expressão foram: *lpp0972* (*EnhA*), *lpp1315*, *lpp1340* e o *lpp1900*. Estes genes apresentaram-se reprimidos após a co-cultura em *A. castellanii*.

4- CONCLUSÕES

A adaptação a um hospedeiro específico, a virulência e a prevalência epidemiológica da *L. pneumophila* continuam a ser questões interessantes ainda por responder [72].

A demonstração em laboratório da passagem da legionela de um estado viável mas não cultivável ao estado cultivável após a absorção pela *A. castellanii* (hospedeiro natural) sugere que a interacção com protozoários é um factor fundamental na evolução da patogenicidade da legionela [72]. A capacidade de crescer intracelularmente em protozoários tem gerado durante a sua evolução, um conjunto de traços de virulência que permitem à legionela infectar também células humanas [10].

Ao longo do tempo, as bactérias têm desenvolvido sofisticados circuitos de regulação que levam à modulação da expressão génica em resposta a diferentes ambientes.

A transcrição reversa, seguida por PCR em tempo real é uma técnica preponderante para a detecção de níveis baixos de mRNA [35]. Por isso desenhar e otimizar uma técnica de PCR em tempo real que permitisse o estudo da expressão génica da estirpe *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* foi o principal objectivo deste trabalho.

A escolha dos genes alvo para este estudo teve por base os resultados de uma primeira abordagem feita por *Microarrays*. Essa escolha incidiu maioritariamente sobre os genes que apresentaram maiores níveis de indução ou repressão, recaindo preferencialmente sobre genes hipotéticos por serem, por um lado os mais variáveis e por outro, porque se pretendia iniciar um trabalho apostando em genes que ainda nenhuma outra equipa de investigação se debruçara.

Para atingir o objectivo proposto foi necessário, numa primeira fase, adquirir treino e controlo sobre o processo de realização das culturas líquidas e dos ciclos de infecção, tendo-se encontrado algumas dificuldades pois a utilização de meios muito ricos em nutrientes facilitou contaminações com microrganismos ambientais mesmo seguindo as boas práticas laboratoriais.

A obtenção do mRNA para o estudo da expressão génica implicou a obtenção das suspensões de *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii*. Até à obtenção destas suspensões efectuaram-se vários passos que tiveram como dificuldade acrescida a sua morosidade e a possibilidade de introdução de contaminação no processo.

Numa primeira etapa, foi necessário monitorizar a cultura líquida da *Lp* Paris, de hora a hora, a partir das 20h de crescimento, de modo a encontrar o momento exacto para a recolha da suspensão a inocular nas amibas. Numa segunda etapa, foi necessário acertar a densidade óptica da suspensão por forma a obter a concentração exacta para inocular as amibas. Numa terceira etapa, após a inoculação da *A. castellanii* com a *Lp* Paris, foi necessário eliminar todas as legionelas que não foram fagocitadas pela amiba, para tal procedeu-se a várias lavagens com meio de infecção. Por último, durante o ciclo de infecção e aproximadamente, a partir das 20h de co-cultura, foi necessário observar os frascos de cultura de hora a hora, para determinar o momento em que 90% das amibas foram lisadas.

Só após estas manipulações se procedeu à recolha das bactérias que posteriormente foram alvo de extracção de mRNA. Assim, mesmo trabalhando em câmara de fluxo laminar e de acordo com as boas práticas laboratoriais, verificaram-se algumas contaminações na cultura líquida e em alguns ciclos de infecção que inviabilizaram a obtenção de um maior número de réplicas biológicas para a análise da expressão génica.

Para a obtenção do mRNA utilizou-se um kit de extracção que apresentou baixo rendimento, o que implicou o processamento de maior número de frascos durante os ciclos de infecção a fim de obter mais legionela após a co-cultura e assim, obter a quantidade de cDNA necessário para o estudo de todos os genes alvo. Este baixo rendimento do kit de extracção foi o responsável por só se ter efectuado o estudo da expressão genica dos 12 genes, em duas réplicas biológicas. Em outros dois ensaios a concentração do extracto de mRNA não permitiu obter volume suficiente de cDNA para efectuar todas as sessões de PCR e por isso os resultados obtidos não foram mencionados nesta dissertação.

O desenho e optimização da PCR em tempo real foi um objectivo atingido tendo sido possível assegurar uma metodologia sensível, específica, reprodutível e eficiente para todos os genes seleccionados.

No que respeita à expressão génica analisando os resultados obtidos podemos concluir que o perfil da expressão génica de *Lp* Paris foi modificado pela interacção com *A. castellanii*, mas essa mudança foi dependente da fase do seu ciclo de vida. O impacto desta variação na virulência da bactéria é ainda desconhecido.

4.1 - Perspectivas futuras

O presente projecto de investigação foi apenas a base de um vasto estudo ainda por desenvolver, para que se possam inferir considerações conclusivas sobre o aumento da patogenicidade da *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* e o quanto essa interacção poderá influenciar a infecciosidade da *L. pneumophila* em células fagocíticas humanas nomeadamente nos macrófagos alveolares.

Seguem-se alguns pontos que penso serem pertinentes para estudos futuros:

- Desenhar e validar novos *primers* para os genes cujos *primers* foram rejeitados no decorrer deste projecto (*lpp1293*, *lpp1612a*, *lpp2092* e *lpp2694*);
- Realizar pelo menos três réplicas biológicas com culturas líquidas de *Lp* Paris em fase estacionária precoce e fase estacionária tardia de modo a validar ou contrapor os resultados apresentados nesta dissertação;
- Inferir sobre o envolvimento na infecciosidade da *L. pneumophila* dos genes cuja expressão foi alterada. Para tal, construir mutantes e avaliar o seu desempenho em ensaios de infecção com condições similares às utilizadas no presente trabalho.

- Avaliar possíveis funções dos genes que neste estudo revelaram alteração de expressão após a co-cultura em *A. castellanii* e cuja função permanece ainda desconhecida;
- Transpor todo o processo de infecção de *Lp* Paris para linhas celulares de macrófagos estabelecendo possíveis semelhanças com a infecção em *A. castellanni*.

5 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS.** 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol.* Sep;64(9):3127-33. Review
2. **Álvares E, Valença J, Brum G, Gonçalves J Rosal, Monteiro F, Monteiro J T, Couto A, Freitas e Costa M.** 1998. Pneumonia a *Legionella pneumophila*. Um estudo Retrospectivo. *Sociedade Portuguesa de Pneumologia.* Página:139 *Sociedade Portuguesa de Pneumologia*
3. **Applied Biosystems** 2011. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR – http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf. Janeiro 2012
4. **Applied Biosystems** 2011. Real Time PCR vs Traditional PCR vs Digital PCR <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.html?ICID=EDI-Lrn2>. Janeiro 2012.
5. **Applied Biosystems** 2011. Real-time PCR: Understanding Ct http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf Janeiro 2012
6. **Applied Biosystems** 2012. Essentials of Real Time PCR http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042485.pdf. Abril 2012
7. **Aurell H, Etienne J, Forey F, Reyrolle M, Girardo P, Farge P, Decludt B, Campese C, Vandenesch F, Jarraud S.** 2003. *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *J Clin Microbiol.* Jul;41(7):3320-2
8. **Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE.** 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med.* Apr;90(4):656-8.

9. **Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppée JY, Buchrieser C.** 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol. Aug;8(8):1228-40.
10. **Buchrieser C.** 2011. Legionella: from protozoa to humans. Front Microbiol.;2:182
11. **Bustin SA.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. Oct;25(2):169-93.
12. **Byrne B, Swanson MS.** 1998 Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect Immun. Jul;66(7):3029-34.
13. **Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet. Nov;36(11):1165-73.
14. **Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS.** 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. Infect Immun. Aug;62(8):3254-61.
15. **Costa J, Tiago I, da Costa MS, Veríssimo A.** 2005 Presence and persistence of Legionella spp. in groundwater. Appl Environ Microbiol. Feb;71(2):663-71.
16. **Diederer BM.** 2008. Legionella spp. and Legionnaires' disease. J Infect. Jan;56(1):1-12. Review
17. **Direcção Geral de Saúde** 2001. Doença dos Legionários - Guia Prático. Disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i005841.pdf> Fevereiro 2012
18. **Direcção Geral de Saúde** 2004. “Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários: Investigação Epidemiológica, Circular Normativa Nº: 06/DT, 2004. Disponível em: http://www.arsalentejo.min-saude.pt/saudepublica/SaudeAmbiental/Legionarios/Documents/CNormativa%20n%C2%BA%206_DT.pdf. Fevereiro 2012

19. **Direcção Geral de Saúde** 2004. “Programa de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença dos Legionários: Notificação Clínica e Laboratorial, Circular Normativa N.º: 05/DEP, 2004. Disponível em: http://www.arsalentejo.min-saude.pt/saudepublica/SaudeAmbiental/Legionarios/Documents/CNormativa%20n%C2%BA%205_DEP.pdf. Janeiro 2012
20. **Direcção Geral de Saúde** 2007. Doenças de Declaração Obrigatória (2002-2006), Lisboa. Disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>. Janeiro 2012
21. **Dussault AA, Pouliot M.** 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online*.;8:1-10. Epub 2006 Jan 25.
22. **Edelstein PH, Metlay JP.** 2009. Legionella pneumophila goes clonal-Paris and Lorraine strain-specific risk factors. *Clin Infect Dis*. Jul 15;49(2):192-4.
23. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF.** 2006 Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. Jan;19(1):165-256.
24. **European Legionnaires’ disease Surveillance Network (ELDSNet)** 2012. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/index.aspx>. Janeiro 2012
25. **European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)** 2012 Disponível em: <http://www.ewgli.org/>. Março 2012
26. **European Working Group for Legionella Infections** 2011. Sequence-Based Typing (SBT) Database for Legionella pneumophila - http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php. Dezembro 2011
27. **European Working Group for Legionella Infections** 2012. Technical Guidelines 2011. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Documents/EWGLI-Technical-Guidelines.pdf>. Janeiro 2012
28. **Fields BS, Benson RF, Besser RE.** 2002. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*. Jul;15(3):506-26. Review.

29. **Fittipaldi M, Codony F and Morató J.** 2010. Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *Water SA* Vol. 36 No. 4 July 2010: 417-424
30. **Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH.** 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* Jan;41(1):9-16.
31. **Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS.** 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* Dec 1;297(22):1189-97
32. **Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS.** 2002 Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun.* Nov;70(11):6273-83.
33. **German Collection of Microorganisms and Cell Cultures** 2012. Disponível em:http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Legionella. Fevereiro 2013
34. **Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW Jr, Kassanoff I.** 1978. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* Feb;107(2):149-60.
35. **Goerke C, Bayer MG, Wolz C.** 2001. Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clin Diagn Lab Immunol.* Mar;8(2):279-82.
36. **Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C.** 2009. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* Sep;9(5):727-39
Review
37. **Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C.** 2010. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol.* Apr;76(1):1-11.
38. **Huang B, Yuan Z, Heron BA, Gray BR, Eglezos S, Bates JR, Savill J.** 2006. Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1

- isolates from patients and water in Queensland, Australia. *J Med Microbiol.* Aug;55(Pt 8):993-7.
39. **Hubber A, Roy CR.** 2010 Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Nov 10;26:261-83.
 40. **Institute of Pathogen Biology, CAMS&PUMC** 2012. Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Disponível em: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Legionella> Abril 2012
 41. **Invitrogen** 2011. Fast SYBR® Green Master Mix Protocol. Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_046776.pdf Novembro 2011
 42. **Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M.** 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol.* Jan;7(1):13-24. Epub 2008 Nov 17.
 43. **Jan Van Wijngaarden, Carol Joseph, John Lee, Maddalena Castellani Pastoris and Vladimir Drasar.** 2005. "European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires` Disease"
 44. **Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB, Brachman PS.** 1981. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol.* Sep;114(3):337-47.
 45. **Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N.** 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* Apr-Jun;27(2-3):95-125. Review.
 46. **Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiota-Bernard P, Etienne J, Nauciel C.** 1999. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol.* Aug;37(8):2652-5.
 47. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec;25(4):402-8.

48. **Mackay IM.** 2004 Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. Mar;10(3):190-212.
49. **Mandell, Douglas, and Bennett's.** 2010. Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Edition. Expert Consult Premium Edition. Elsevier
50. **Marques AS, Estrada MH.** 2005. Pneumonia a *Legionella* – A propósito de um caso clínico. Revista Portuguesa de Pneumologia. Vol XI N.º 2 Março/Abril
51. **Marques MT.** 1999. Contribuição para o estudo do género *Legionella* e a sua ocorrência em Portugal. (Tese de doutoramento apresentada na Faculdade de Medicina de Lisboa). Universidade Nova de Lisboa. Arquivos do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana. Tomo XXIII:89-218.
52. **McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR.** 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med. Dec 1;297(22):1197-203.
53. **McDade JE, Shepard CC.** 1979 Virulent to avirulent conversion of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) its effect on isolation techniques. J Infect Dis. Jun;139(6):707-11.
54. **Mentasti, M. and Fry, N.K** 2009. Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* Version 4.2. Disponível em: Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* (Version 4.2). Dezembro 2011
55. **Michael J. Mahan, Douglas M. Heithoff, Robert L. Sinsheimer, David A. Low.** 2000. Assessment of Bacterial Pathogenesis by analysis of gene expression in the host. Annu. Rev. Genet. 34:139–64
56. **Ministério da Saúde** 2003. Doença dos legionários. Protocolo de Diagnóstico. Disponível em: http://www.arslvt.min-saude.pt/SiteCollectionDocuments/SPublica/DLegionarios/DL_Protocolo.pdf. Fevereiro 2012
57. **Molofsky AB, Swanson MS.** 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Mol Microbiol. Jul;53(1):29-40.
58. **Murdoch DR.** 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis. Jan 1;36(1):64-9
59. **Murray P. et al** – Manual of clinical microbiology, 8th edition, 2003; p.809-911

60. **National Center for Biotechnology Information** 2011. NCBI Genome. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. Abril 2012
61. **Palusińska-Szys M, Cendrowska-Pinkosz M.** 2009. Pathogenicity of the family Legionellaceae. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). Jul-Aug;57(4):279-90. Review.
62. **Peirson SN, Butler JN, Foster RG.** 2003 Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Res. Jul 15;31(14):e73
63. **Pfaffl MW.** 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. May 1;29(9):e45.
64. **Pruckler JM, Benson RF, Moyenuddin M, Martin WT, Fields BS.** 1995. Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 63:4928–32
65. **Qiagen 2010.** Analyzing Gene Expression and Regulation 07/2010 Disponível em: <http://www.qiagen.com/search/search.aspx?SearchTerm=Analyzing+Gene+Expression+and+Regulation&start=0&category=0&num=20>. Abril 2012
66. **Qiagen 2012.** Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Disponível em: <http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/qPCR/QiagenRT-PCR.pdf>. Abril 2012
67. **Rowbotham TJ.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33:1179–83
68. **Rutledge RG, Côté C.** 2003 Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Res. Aug 15;31(16):e93.
69. **Saunders NA, Harrison TG, Kachwalla N, Taylor AG.** 1988. Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*. J Gen Microbiol. Aug;134(8):2363-74.
70. **Segal G, Shuman HA.** 1999. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. Infect Immun. May;67(5):2117-24.
71. **Shin S, Roy CR.** 2008. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol. Jun;10(6):1209-20. Epub 2008 Mar 17. Review.

72. **Steinert M, Hentschel U, Hacker J.** 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev.* Jun;26(2):149-62. Review.
73. **Swanson MS, Hammer BK.** 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:567-613
74. **Swanson, M.** 2007. Michele Swanson: University of Michigan Department of Microbiology and Immunology. Disponível em: http://www.med.umich.edu/microbio/bio/swanson_m.htm.
75. **Tiaden A, Spirig T, Carranza P, Brüggemann H, Riedel K, Eberl L, Buchrieser C, Hilbi H.** 2008. Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila* lqs genes to pathogen-host interactions. *J Bacteriol.* Nov;190(22):7532-47.
76. **Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P, Mathieu L.** 2006. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health.* Apr 28;6:112.
77. **Valeyre D, Dournon E, Jeantils V, Kemeny JL, Blin F, Battesti JP.** 1981. Legionnaires disease: 3 cases from the northern suburbs of Paris (author's transl) *Rev Fr Mal Respir.*;9(3):221-8.
78. **VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM.** 2008 Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* Apr;44(5):619-26.
79. **World Health Organization** 2007. “*Legionella* and prevention of Legionellosis”, WHO 2007, Geneve. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf. Fevereiro 2012
80. **Zhu W, Banga S, Tan Y, Zheng C, Stephenson R, Gatley J, Luo ZQ.** 2011. Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One.* Mar 9;6(3):e17638. (Wenhan 2010)

Meio de extracto de levedura tamponado com ACES (AYE)

1. Pesar na balança analítica (Kern EG):
 - 0,125g de pirofosfato de ferro (Sigma);
 - 5g de ACES (Applichem);
 - 5g de Extracto de levedura (BiokarDiagnostics);
 - 0,2g de L-cysteina (Applichem);
2. Dissolver a quente e com agitação (Bunsen) o pirofosfato de ferro em 50 ml de água destilada (deixar arrefecer);
3. Dissolver com agitação o ACES e o extracto de levedura em 450ml de água destilada;
4. Acertar a pH= 6,9 (pH Meter – Metrhm);
5. Adicionar à mistura do ponto 3, a L-cysteina e a solução de pirofosfato de ferro preparada previamente no ponto 2;
6. Esterilizar o meio com filtro de 0,22 µm na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair).

Cultura de *Lp* Paris em meio BCYE- α

1 - Preparação do meio BCYE- α (100ml):

- 1.1 - Pesar 2,77g de *Legionella* CYE agar base (Oxoid);
- 1.2 - Adicionar 100 ml de água destilada;
- 1.3 - Ferver;
- 1.4 - Autoclavar (Heraeus - Kendro) a 120°C durante 20 minutos;
- 1.5 - Deixar arrefecer até atingir a temperatura de 60°C;
- 1.6 - Adicionar o suplemento *Legionella* BCYE *growth* (Oxoid) e agitar;
- 1.7 - Distribuir por cada placa de *Petri* (90 mm de diâmetro), 20 ml de meio em câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair);
- 1.8 - Guardar a 2 a 8°C.
- 1.9 - Para testar a esterilidade, colocar uma placa na estufa a 37°C (Mettler) durante 48 horas. Observar a ausência ou presença de crescimento.

2 - Sementeira de *Lp* Paris

- 2.1 - Descongelar a estirpe armazenada a -80°C em meio de conservação (meio de Thioglicolato com 15% de Glicerol);
- 2.2 – Semear em placa de BCYE- α recorrendo à técnica de quadrante;
- 2.3 - Colocar na estufa a 37°C (Mettler) durante 48 horas.

Meio com peptona extracto de levedura e glucose (PYG)

1 - Preparação das várias soluções *stock*:

- Cloreto de cálcio (CaCl_2) (0,05M)
- Di-Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,25M)
- Sulfato de Magnésio (MgSO_4) (0,4M)
- Di-sódio hidrogenofosfato (Na_2HPO_4) (0,25M)
- Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) (0,005M)

1.1 - Pesar na balança analítica (Kern EG):

- 0,28g de Cloreto de Cálcio (Merck);
- 1,7g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio (Merck);
- 4,93g de Sulfato de Magnésio (Merck);
- 1,775g de Di-sódio Hidrogenofosfato (Applichem);
- 0,1863g de Pirofosfato de Ferro (Sigma);

1.2 - Dissolver separadamente cada um dos componentes em copos com 50 ml de água destilada, guardar a 4°C. O pirofosfato de ferro deverá ser dissolvido a quente e com agitação (Bunsen), guardar a -20°C.

2 - Meio com peptona extracto de levedura e glucose (PYG)

2.1 - Pesar na balança analítica (Kern EG):

- 1g de Citrato de Sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) (Applichem)
- 20g de Triptona (Biokar)
- 1 g de Extracto de Levedura (Biokar)
- 18 g de Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Applichem)

2.2 - Dissolver todos os componentes em 950 ml de água destilada e adicionar 10 ml de cada uma das soluções de *stock* previamente preparadas KH_2PO_4 (0,25M); MgSO_4 (0,4M); Na_2HPO_4 (0,25M); $\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$ (0,005M) e 8 ml de CaCl_2 (0,05M)

2.3 - Agitar e esterilizar o meio com filtro de 0,22 µm na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire) recorrendo a bomba de vácuo (Selecta).

2.4 - Para testar a esterilidade, colocar 2 a 3 ml de meio numa placa de *Petri* estéril. Deixar na estufa a 37°C (Memmert) durante uma semana (o meio fica de quarentena até terminar a observação da placa de *Petri*).

Meio de infecção (MI)

1 - Preparação das várias soluções *stock*:

- Cloreto de cálcio (CaCl_2) (0,05M)
- Di-Hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,25M)
- Sulfato de Magnésio (MgSO_4) (0,4M)
- Di-sódio hidrogenofosfato (Na_2HPO_4) (0,25M)
- Pirofosfato de ferro ($\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$) (0,005M)

1.1 - Pesar na balança analítica (Kern EG):

- 0,28g de Cloreto de Cálcio (Merck);
- 1,7g de Di-Hidrogenofosfato de Potássio (Merck);
- 4,93g de Sulfato de Magnésio (Merck);
- 1,775g de Di-sódio Hidrogenofosfato (Applichem);
- 0,1863g de Pirofosfato de Ferro (Sigma);

1.2 - Dissolver separadamente cada um dos componentes em copos com 50 ml de água destilada e guardar a 4°C. O Pirofosfato de Ferro deverá ser dissolvido a quente e com agitação (Bunsen), guardar a -20°C.

2 - Meio de Infecção (MI)

2.1 - Pesar na balança analítica (Kern EG):

- 1g de Citrato de Sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) (Applichem)

2.2 - Dissolver em 950 ml de água destilada e adicionar 10 ml de cada uma das soluções de *stock* previamente preparadas de KH_2PO_4 (0,25M); MgSO_4 (0,4M); Na_2HPO_4 (0,25M); $\text{Fe}_4\text{O}_{21}\text{P}_6$ (0,005M) e 8 ml de CaCl_2 (0,05M).

2.3 - Agitar e esterilizar o meio com filtro de 0,22 μm na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuaire) recorrendo a bomba de vácuo (Selecta).

2.4 - Para testar a esterilidade, colocar 2 a 3 ml de meio numa placa de *petri* estéril. Deixar na estufa a 37°C (Mettmert) durante uma semana (o meio fica de quarentena até terminar a observação da placa de *petri*).

Extracção de RNA
INVITRAP® SPIN CELL RNA MINI KIT – Invitek

Componentes do kit

- Solução de Lise R
- Tampão de lavagem R1
- Tampão de lavagem R2
- Tampão de eluição R
- Tubos *DNA-Binding Spin Filter*
- Tubos Receptores 2,0 ml
- Tubos *RNA-RTA Spin Filter Set*
- Tubos *RTA Receiver Tubes*
- Tubos de eluição
- Manual

Preparações iniciais:

Preparação de etanol a 96-100% (Merk)

Preparação da solução de lise R 1/100 volume com β -Mercaptoetanol (por amostra):

Adicionar 10 μ l β -Mercaptoetanol (Sigma) a 990 μ l Solução de Lise R*

* Agitar suavemente antes de usar e esperar um pouco devido à formação de espuma.

Preparação da Lisozima em Tampão TE (10 mM Tris/HCl (Sigma); 1mM EDTA (Sigma) pH=8, esterilizado com filtro de 0,22 μ m na câmara de fluxo laminar Classe II (Nuair)) (por amostra):

Adicionar 2 μ l de Lisozima (20mg/ml) (Sigma) + 100 μ l de tampão TE

Protocollo

-

22. Descartar o “*RTA Receiver Tube*”
23. Transferir o RNA-RTA para um novo tubo – Tubo de eluição,
24. Pipetar 50 µl de Tampão de Eluição **R** para a membrana do “*RTA Spin Filter*”
25. Incubar 2 minutos à temperatura ambiente
26. Centrifugar 1 minuto, 9830 x g a 4°C,
27. Recolocar o eluído na coluna,*
28. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente,*
29. Centrifugar 1 minuto, 9830 x g a 4°C,*
30. Descartar o “*RNA-RTA*”.
31. Guardar imediatamente o RNA Total a - 80°C

Electroforese em gel de agarose 1,5%

Preparação do Gel

1. Dissolver a quente 0,525 g de agarose (Invitrogen) em 35 ml de tampão de electroforese Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x (Gibco);
2. Deixar arrefecer até 60°C e juntar 2 µl brometo de etídeo (Bio-Rad);
3. Colocar o pente em posição conveniente no molde para um correcto posicionamento dos poços e verter a agarose sobre o molde eliminando eventuais bolhas de ar;
4. Deixar solidificar;
5. Retirar o pente;
6. Colocar o gel na tina de electroforese e adicionar tampão TBE 0,5 x até este ficar submerso.

Preparação das Amostras

1. Aplicar 2,5 µl de marcador de DNA (*Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder* - Invitrogen) (Figura 38) no respectivo poço;
2. Pipetar 2 µl de Blue de Tdye (3,5 ml de TBE 10x + 5 ml glicerol + 1 ml de azul de bromofenol (1%) + 0,5 ml de EDTA (0,5M)) para um pedaço de parafilme e adicionar 6 µl de amostra (RNA; DNA ou cDNA)
3. Aplicar 6 µl desta mistura no respectivo poço;
4. Migrar durante 45 minutos a 110 volts (Tina Horizont 58);
5. Retirar o gel da tina de electroforese, examina-lo à radiação ultra-violeta no transiluminador (Unitec)
6. Fotografar para arquivar (Kodak).

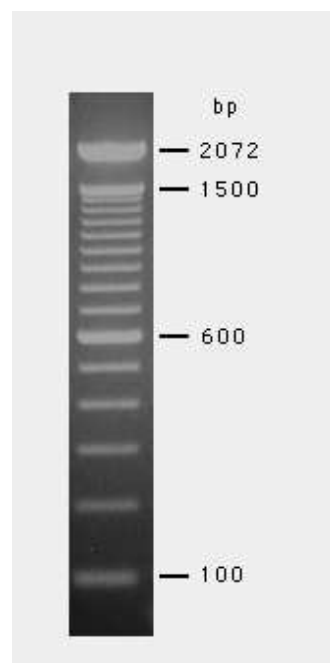


Figura 38 - Marcador de DNA 100 bp em gel de agarose 2%

Tratamento com DNase

TURBO DNA-free™ Kit - Ambion

Componentes do kit

- Turbo DNase (2 Unidades/μl)
- Tampão Turbo DNase 10x
- Reagente de Inativação de DNase
- Água livre de nucleases

Quantificação do RNA:

Quantificar o RNA total (espectrofotômetro WPA UV1101)

$$\text{Concentração de RNA} = (\text{Abs}_{260\text{nm}} \times 40 \times V_{\text{Total}}) / V_{\text{RNA}}$$

Tratamento com DNase

1. Pipetar para microtubo de 200 μl os seguintes volumes: *
 - 2 μl Tampão Turbo DNase 10x
 - 1,5 μl Turbo DNase
 - Volume de RNA (suficiente para ter uma concentração de 250 ng/μl)
 - Água livre de nucleases (para perfazer um volume final de 18,5 μl)
2. Colocar a 37°C durante 30 minutos (T-Gradient – Biometra), *
3. Adicionar 1,5 μl de Turbo DNase, *
4. Colocar a 37°C durante 30 minutos (homogeneizar bem) (T-Gradient – Biometra), *
5. Adicionar 4 μl de reagente de inativação e homogeneizar,
6. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente agitando ocasionalmente (tende a precipitar) *
7. Centrifugar 2 minutos a 10000 x g (Mikro 22R – Hettich)
8. Transferir **10 μl do RNA** tratado para um novo tubo
9. Armazenar a -80°C.

* | Pontos de otimização

Síntese de cDNA

SuperScript III – Invitrogen

1. Pipetar para microtubo de 200 µl os seguintes volumes:
 - 10 µl RNA total (tratado com DNase)
 - 1 µl Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) (Invitrogen)
 - 1 µl *Hexaprimer* (Roche)
 - Água livre de nucleases (para perfazer um volume final de 13 µl)
2. Aquecer a mistura a 65°C durante 5 minutos e de seguida colocar em gelo durante 1 minuto;
3. Fazer *spin* (MiniSpin – Eppendorf);
4. Colocar o microtubo em gelo e adicionar os seguintes volumes:
 - 4 µl 5x *First-Strand Buffer* (Invitrogen)
 - 1 µl Ditioneitol (DTT) (0,1M) (Invitrogen)
 - 1 µl *Recombinant RNase Inhibitor* (RNaseOUT) (Invitrogen)
 - 1 µl *SuperScript III RT* (Invitrogen)
5. Homogeneizar (com pipeta) e incubar 5 minutos a 25°C;
6. Incubar 60 minutos a 55°C;
7. Parar a reacção pelo aquecimento a 70°C durante 15 minutos;
8. Armazenar a -80°C.

Todos os processos de aquecimento foram realizados no equipamento T Gradient - Biometra

Resultados de *Microarrays* (técnica anteriormente efectuada na “*Unité de Biologie des Bactéries Intracellulaires do Departement de Génomes et Génétique, Institut Pasteur de Paris*”), obtidos por Maria de Jesus Chasqueira, (tese de doutoramento em preparação). Encontram-se realçados os genes seleccionados para este projecto.

Genes Induzidos

<i>gene.ID</i>	<i>Description</i>	<i>Expression</i>
lpp1316_lspG type II secretory pathway protein LspG	type II secretory pathway protein LspG	10,72
lpp1330_lpp1330	Similar to hypothetical protein	6,77
lpp2607_lpp2607	lpp2607	6,46
lpp0094_lpp0094	lpp0094	6,24
lpp1612a_lpp1612a	Similar to N-terminal part of sidB protein	6,04
lpp1612b_lpp1612b	C-terminal part of L. pneumophila sidB protein	5,34
lpp1139_lpp1139	lpp1139	4,79
lpp0506_lpp0506	lpp0506	4,66
lpp2643_parB1	similar to partition protein ParB	4,63
lpp0845_csrA global regulator CsrA	global regulator CsrA	4,51
lpp0045_lpp0045	Similar to sterol desaturase	4,25
lpp0953_lpp0953	Similar to kynurenine 3-monooxygenase	4,05
lpp1992_gmk guanylate kinase	guanylate kinase	3,73
lpp2287_lpp2287	lpp2287	3,67
lpp2644_lpp2644	lpp2644	3,50
lpp1559_lpp1559	lpp1559	3,47
lpp1991_rpoZ RNA polymerase omega subunit	RNA polymerase omega subunit	3,26
lpp2093_lpp2093	similar to L. pneumophila SdeA protein	3,20
lpp1315_lspH type II secretory pathway protein LspH	type II secretory pathway protein LspH	3,20
lpp0963_lpp0963	lpp0963	3,19
lpp2865_lpp2865	lpp2865	3,19
lpp2948_gidA	Highly similar to glucose-inhibited division protein A GidA	3,06
lpp2092_sdeC SdeC protein, substrate of the Dot/Icm system	SdeC protein- substrate of the Dot/Icm system	3,04
lpp1993_lpp1993	Similar to conserved hypothetical protein	2,97
lpp0503_lpp0503	ankyrin repeat protein	2,91
lpp2762_rplM	50S ribosomal subunit protein L13	2,91
lpp0733_lpp0733	lpp0733	2,80
lpp2761_rpsI 30S ribosomal subunit protein S9	30S ribosomal subunit protein S9	2,72
lpp1376_rpsA 30S ribosomal protein S1	30S ribosomal protein S1	2,71
lpp1860_lpp1860	Similar to major facilitator family transporter (phtJ)	2,69
lpp1004_lpp1004	Similar to GTPases	2,66
lpp0590_lvgA	virulence protein	2,60
lpp2947_lpp2947	lpp2947	2,55

lpp2742_icmW	Intracellular multiplication protein IcmW	2,50
lpp0521_icmJ/dotN	icmJ/dotN	2,47
lpp2629_lpp2629	lpp2629	2,46
lpp2949_gidB	Similar to glucose inhibited division protein B GidB	2,44
lpp1828_clpX ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	2,42
lpp0655_lpp0655	similar to cysteine desulfurase and to selenocysteine lyase	2,42
lpp1990_spoT guanosine-3',5'-bis(diphosphate)3'-pyrophosphohydrolase	guanosine-3 -5 -bis(diphosphate) 3 -pyrophosphohydrolase	2,42
lpl2084	lpl2084	2,39
lpp0134_lpp0134	Some similarity with L. pneumophila IcmL/DotI	2,38
lpp2242_rluC Ribosomal large subunit pseudouridine synthase	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase	2,26
lpp0735_glnE	similar to glutamine synthetase adenylyltransferase	2,23
lpp2951_parB2	similar to chromosome partitioning protein parB	2,22
lpp1951_lpp1951	hypothetical gene	2,21
lpp0653_lpp0653	Similar to ABC transporter ATP-binding protein	2,20
lpp0651_lpp0651	Similar to conserved hypothetical protein	2,19
lpp2096_sdeA	sdeA	2,17
lpp0657_lpp0657	Similar to conserved hypothetical protein	2,12
lpp2636_lpp2636	lpp2636	2,09
lpp2741_icmV intracellular multiplication protein IcmV	intracellular multiplication protein IcmV	2,09
lpp0509_icmR	icmR	2,08
lpp0193_lpp0193	Similar to putative phage excisionase	2,07
lpp0652_lpp0652	Similar to ABC transporter- permease component	2,06
lpp0202_lpp0202	Ankyrin repeat protein	2,04
lpp0699_rtxA-1	structural toxin protein RtxA	2,03
lpp2950_parA	Highly similar to chromosome partitioning protein ParA family	2,00

Genes **Reprimidos**

<i>gene.ID</i>	<i>Description</i>	<i>Expression</i>
lpp1294 flaA flagelline	flagelline	-10,85
lpp1177_lpp1177	lpp1177	-5,79
lpp1293_lpp1293	lpp1293	-5,28
lpp1340_lpp1340	lpp1340	-5,13
lpp1900_lpp1900	lpp1900	-4,71
lpp0162_lpp0162	Similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	-4,70
lpp2010_hemE	Uroporphyrinogen decarboxylase	-4,57
lpp0728_lpp0728	similar to acetoacetate decarboxylase	-4,44
lpp0161_lpp0161	Similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	-4,40
lpp2299_lpp2299	Similar to alkyl hydroperoxide reductase AhpC	-4,37
lpp1901_lpp1901	Similar to conserved hypothetical protein	-4,30
lpp0727_lpp0727	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase	-4,25
lpp1291_fliS	Similar to flagellar protein FliS	-4,20
lpp1292_fliD	Similar to flagellar hook-associated protein 2 (flagellar capping protein)	-4,16
lpp0160_lpp0160	Similar to Wolinella succinogenes hypothetical protein	-4,13
lpp0969_flgM	Similar to negative regulator of flagellin synthesis (Anti-sigma-28 factor)	-4,12
lpp1410_lpp1410	Similar to probable multidrug efflux protein	-4,10

lpp0972_lpp0972	Similar to enhanced entry protein EnhA	-4,02
plpp0080	Similar to protein	-3,82
lpp1890_lpp1890	similar to type IV pilin PilA	-3,74
lpp1116_lpp1116	similar to other protein- ATP binding site	-3,72
lpp1902_lpp1902	Similar to conserved hypothetical protein	-3,72
lpp0541_lpp0541	similar to putative sigma-54 modulation protein	-3,70
lpp0725_lpp0725	Similar to hypothetical protein	-3,70
lpp0729_lpp0729	Similar to protein	-3,69
plpp0090	Weakly similar to stability protein StbD	-3,62
lpp1170_lpp1170	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	-3,59
lpp2856_lpp2856	Similar to conserved hypothetical protein	-3,57
lpp0730_lpp0730	similar to adenylate cyclase	-3,52
lpp0723_lpp0723	Similar to conserved hypothetical protein	-3,48
lpp2265_lpp2265	Similar to conserved hypothetical protein	-3,38
plpp0089	Weakly similar to stability protein StbE	-3,26
lpp2497_lpp2497	Similar to 2-(5'-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase	-3,23
lpp2498_lpp2498	Similar to malonyl-CoA acyl-carrier-protein transacylase	-3,20
lpp2694_enhA enhanced entry protein EnhA	enhanced entry protein EnhA	-3,19
lpp2478_lpp2478	similar to other proteins	-3,08
lpp0351_lpp0351	regulatory protein (EAL domain)	-3,08
lpp1538_lpp1538	some similarities to cytochrome B561	-3,04
lpp0724_lpp0724	Similar to conserved hypothetical protein	-3,00
lpp0029_lpp0029	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	-2,99
lpp2494_lpp2494	Similar to malonate decarboxylase- beta subunit	-2,98
lpp0542_rpoN RNA polymerase sigma-54 factor (sigma-L)	RNA polymerase sigma-54 factor (sigma-L)	-2,92
lpp2495_lpp2495	Similar to malonate decarboxylase- gamma subunit	-2,90
lpp1115_lpp1115	similar to other proteins	-2,82
lpp2692_enhC enhanced entry protein EnhC	enhanced entry protein EnhC	-2,82
lpp1396_lpp1396	similar to phosphate starvation-inducible protein PhoH	-2,78
lpp2461_lpp2461	lpp2461	-2,75
lpp2368_lpp2368	lpp2368	-2,74
lpp0403_rpsQ 30S ribosomal protein S17	30S ribosomal protein S17	-2,74
lpp2853_lpp2853	Similar to conserved hypothetical protein	-2,74
lpp2496_lpp2496	Similar to phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase	-2,70
lpp1854_lpp1854	Q-rich protein	-2,65
lpp0907_lpp0907	weakly similar to anti-anti-sigma factor	-2,60
lpp2209_lpp2209	lpp2209	-2,58
plpp0088	Similar to transcriptional regulator	-2,58
lpp2603_lpp2603	Similar to conserved hypothetical protein	-2,57
lpp0905_lpp0905	similar to protein	-2,55
lpp0299_lpp0299	regulatory protein (GGDEF domain)	-2,52
lpp1481_pilD Type 4 prepilin-like proteins leader peptide processing enzyme	Type 4 prepilin-like proteins leader peptide processing enzyme	-2,49
lpp2569_lpp2569	similar to carbonic anhydrase	-2,49
lpp0679_lpp0679	Similar to eukaryotic proteins	-2,42
lpp3028_lpp3028	Similar to protease	-2,40
lpp0399_rplV 50S ribosomal subunit protein L22	50S ribosomal subunit protein L22	-2,36
lpp0743_htpB 60	6 kDa chaperonin (Protein Cpn6)(groEL protein)(Heat	-2,34

	shock protein B).	
lpp1473_issB	Legionella secretion system protein B	-2,33
plpp0087	Weakly similar to alpha/beta hydrolase fold family protein	-2,32
lpp1290_lpp1290	Similar to enhanced entry protein EnhA	-2,31
lpp2360_lpp2360	Similar to metallo-beta-lactamase superfamily proteins	-2,30
lpp1757_lpp1757	lpp1757	-2,29
lpp2509_lpp2509	lpp2509	-2,28
lpp2129_lpp2129	Similar to multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE	-2,27
lpp2340_lpp2340	predicted membrane protein	-2,26
lpp2659_lpp2659	Similar to protein	-2,26
lpp0392_tufA2 translation elongation factor Tu	translation elongation factor Tu	-2,25
lpp0220_lpp0220	regulatory protein (EAL domain)	-2,23
lpp2523_lpp2523	Similar to two-component response regulator	-2,22
lpp1114_lpp1114	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	-2,22
lpp0298_lpp0298	Hypothetical gene	-2,22
lpp0906_lpp0906	similar to protein	-2,21
lpp0952_lpp0952	regulatory protein (GGDEF and EAL domains)	-2,21
lpp0417_rpsK 30S ribosomal protein S11	30S ribosomal protein S11	-2,21
lpp1015_lpp1015	Similar to long-chain-fatty-acid--CoA ligase	-2,20
lpp0394_rplC 50S ribosomal subunit protein L3	50S ribosomal subunit protein L3	-2,18
lpp0315_lpp0315	similar to C-terminal part of conserved hypothetical protein	-2,17
lpp1539_lpp1539	weakly similar to NADP-specific glutamate dehydrogenase	-2,16
lpp1739_rir2	Similar to ribonucleoside-diphosphate reductase- beta subunit	-2,14
lpp0355_lpp0355	similar to transcriptional regulator lysR family	-2,14
lpp1095_lpp1095	lpp1095	-2,12
lpp0391_fusA translation elongation factor G	translation elongation factor G	-2,12
lpp1273_lpp1273	lpp1273	-2,12
lpp2362_cebB	Chemiosmotic efflux system B protein B	-2,11
lpg0327	lpg0327	-2,11
lpp1903_lpp1903	Similar to conserved hypothetical protein	-2,10
lpp2341_lpp2341	Predicted membrane protein- similar to hypothetical protein	-2,09
lpp0393_rpsJ 30S	30S ribosomal subunit protein S1	-2,07
lpp0512_icmO/dotL	icmO/dotL	-2,06
lpp1788_lpp1788	Similar to acetyl-CoA acetyltransferase	-2,06
lpp0880_clpA ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	-2,06
lpp0314_lpp0314	similar to oxydoreductase	-2,05
lpp1653_lpp1653	similar to thiol:disulfide interchange protein	-2,05
lpp0395_rplD 50S ribosomal subunit protein L4	50S ribosomal subunit protein L4	-2,04
lpp0396_rplW 50S ribosomal subunit protein L23	50S ribosomal subunit protein L23	-2,00
lpp2339_lpp2339	similar to putative cytochrome c family protein.	-1,99
lpp0637_lpp0637	Similar to conserved hypothetical protein	-1,99
lpp2249_lpp2249	lpp2249	-1,99
lpp2487_lpp2487	Some similarity with eukaryotic proteins	-1,98

Folha de cálculo para a determinação da expressão génica relativa da *Lp* Paris após co-cultura em *A. castellanii* utilizando como inoculo

a fase estacionária **precoce** e **tardia**

28 Dezembro 11	Precoce		Média	Amostra		Média	Calibr Est (Gene-Gyr)	Teste Após co-cultura (Gene-Gyr)	ΔCT Test-ΔCT Calibr	2 ^Δ -ΔΔCT	Expressão
							ΔCT Calibrador	ΔCT Teste	ΔΔCT		
	gyr Estacionária (oh)	24,44	24,29	0845 Estacionária (0h)	23,86	23,80	-0,49				
	gyr Estacionária (oh)	24,13		0845 Estacionária (0h)	23,74						
	gyr Após co-cultura (24h)	31,88	31,58	0845 Após co-cultura (24h)	29,87	29,47		-2,11	-1,63	3,084422	3,08
	gyr Após co-cultura (24h)	31,28		0845 Após co-cultura (24h)	29,07						
				1177 Estacionária (0h)	25,18	25,52	1,23				
				1177 Estacionária (0h)	25,85						
				1177 Após co-cultura (24h)	32,53	32,38		0,80	-0,43	1,351911	1,35
				1177 Após co-cultura (24h)	32,22						
15 Fevereiro 12	Tardia		Média	Amostra		Média	Calibr Est (Gene-Gyr)	Teste Após co-cultura (Gene-Gyr)	ΔCT Test-ΔCT Calibr	2 ^Δ -ΔΔCT	Expressão
							ΔCT Calibrador	ΔCT Teste	ΔΔCT		
	gyr Estacionária (oh)	24,08	24,125	0094 Estacionária (0h)	31,09	30,65	6,52				
	gyr Estacionária (oh)	24,17		0094 Estacionária (0h)	30,20						
	gyr Após co-	22,99	22,965	0094 Após co-	33,16	32,91		9,95	3,43	0,093105	-10,74

29 Março 12	cultura (25h)			cultura (25h)									
	gyr Após co-cultura (25h)		22,94	0094 Após co-cultura (25h)		32,66							
				1340 Estacionária (0h)		20,54	19,64	-4,49					
				1340 Estacionária (0h)		18,73							
				1340 Após co-cultura (25h)		23,15	23,33		0,36	4,86	0,034554	-28,94	
				1340 Após co-cultura (25h)		23,51							
	Precoce			Média	Amostra		Média	Calibr Exp (Gene-Gyr)	Teste Est (Gene-Gyr)	ΔCT Test-ΔCT Calibr	2^ΔΔCT	Expressão	
								ΔCT Calibrador	ΔCT Teste	ΔΔCT			
	gyr Estacionária (0h)		25,63	25,68	0094 Estacionária (0h)		27,31	27,38	1,70				
	gyr Estacionária (0h)		25,72		0094 Estacionária (0h)		27,44						
	gyr Após co-cultura (24h)		27,29	27,29	0094 Após co-cultura (24h)		30,16	30,21		2,92	1,22	0,429283	-2,33
	gyr Após co-cultura (24h)		27,29		0094 Após co-cultura(24h)		30,26						
					1340 Estacionária (0h)		20,36	19,87	-5,81				
					1340 Estacionária (0h)		19,38						
					1340 Após co-cultura (24h)		25,22	25,33		-1,96	3,85	0,069589	-14,37
					1340 Após co-cultura (24h)		25,44						

Folha de cálculo para a determinação da expressão génica na fase **estacionária** da cultura líquida

28 Dezembro	Estacionária	Média		Amostra		Média	Calibr (Exp) (Gene-Gyr)	Teste (Est) (Gene-Gyr)	ΔCT Test- ΔCT Calibr	2^ΔΔCT	Expressão
							ΔCT Calibrador	ΔCT Teste	ΔΔCT		
	gyr Exp	24,95	24,84	0845 Exp	25,28	25,44	0,61				
	gyr Exp	24,72		0845 Exp	25,60						
	gyr Estacionária	24,44	24,29	0845 Estacionária	23,86	23,80		-0,49	-1,09	2,12874	2,13
	gyr Estacionária	24,13		0845 Estacionária	23,74						
			1177 Exp	30,55	30,29	5,45					
			1177 Exp	30,02							
			1177 Estacionária	25,18	25,52		1,23	-4,22	18,63574	18,64	
1177 Estacionária			25,85								
		1316 Exp	26,86	26,55	1,71						
		1316 Exp	26,23								
		1316 Estacionária	25,39	25,28		0,99	-0,72	1,647182	1,65		
		1316 Estacionária	25,16								

29 Março	Estacionária	Média		Amostra		Média	Calibr (Exp) (Gene-Gyr)	Teste (Est) (Gene-Gyr)	ΔCT Test-ΔCT Calibr	2^ΔΔCT	Expressão
							ΔCT Calibrador	ΔCT Teste	ΔΔCT		
	gyr Exp	23,57	23,61	1330 Exp	26,63	26,61	3,00				
	gyr Exp	23,65		1330 Exp	26,58						
	gyr Estacionária	25,63	25,68	1330 Estacionária	25,60	25,69	0,01	-2,98	7,917253	7,92	
	gyr Estacionária	25,72		1330 Estacionária	25,77						
			0094 Exp	27,84	27,76	4,15					
			0094 Exp	27,68							
			0094 Estacionária	27,31	27,38		1,70	-2,45	5,464161	5,46	
0094 Estacionária			27,44								

